SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-110752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-22 16:14:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"INMUNOLIGANTES BIESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA TNF E IL-17"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C12P 21/06**

71. SOLICITANTE **ABBVIE INC.**

DOMICILIO NORTH CHICAGO, ESTADO DE ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA.

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

22. BOGOTÁ, D.C. 22 MAY 2014

(FORMA P 10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-110752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-22 16:14:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL-PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I ☐ Capitulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/US2012/061686	Fecha 24/10/12
	Publicación Internacional No.	WO 2013/063110 A1	Fecha 02/05/13
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		
	"INMUNOLIGANTES BIESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA TNF E IL-17"		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
	C07K 16/24		
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor.	Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria	

	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
4.	ABBVIE INC.			

6	DATOS DEL SOLICITANTE			
	DIRECCIÓN	1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064, Estados Unidos de América.	No. TELÉFONO	3264270
	CIUDAD	North Chicago	E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
	DEPARTAMENTO/ESTADO	Illinois	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Estado de Delaware, Estados Unidos de América.
	PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América		

7 (72) INVENTOR (ES) — Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	HSIEH	Chung-Ming	
2.	PEREZ	Jennifer	
3.	BENATUIL	Lorenzo	
4.	KUTSKOVA	Yuliya	
5.	MEMMOTT	John	
6.	ZHONG	Suju	
7.	EATON	Lucia	
8.	HUGUNIN	Margaret	
9.	BRITO	Alyssa	
10.	CLABBERS	Anca	

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

8 DATOS INVENTOR (ES)

	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.	Estados Unidos de América	Massachusetts	Newton	22 Olde Field Road, Newton, MA 02459, Estados Unidos de América.
2.			Worcester	135 Longmeadow Avenue, Worcester, MA 01506, Estados Uni de América.
3.			Northborough	33 Mohawk Drive, Northborough, MA 01532, Estados Unidos de América.
4.			Northborough	183 Whitney Street, Northborough, MA 01532, Estados Unidos de América.
5.			Framingham	10 Cody Road, Framingham, MA 01701, Estados Unidos de América.
6.			Shrewsbury	10 Westport Drive, Shrewsbury, MA 01545, Estados Unidos de América.
7.			Grafton	177 Magill Drive, Grafton, MA 01519, Estados Unidos de América.
8.			Grafton	7 Indian Path, North Grafton, MA 01536, Estados Unidos de América.
9.			Hudson	35 Carter Street, Hudson, MA 01749, Estados Unidos de América.
10.			Rutland	20 Haven Hill Road, Rutland, MA 01543, Estados Unidos de América.

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 (74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE	ALICIA	C.C 39.690.713 T.P .53.215

DIRECCIÓN	Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD	Bogotá	E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS	Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
Estados Unidos de América		US	61/550,619	11/10/24

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas	Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.

14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-0012364	Fecha 03-02-14

15 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante

C.C. 39.690.713 T.P.53.215 Apoderado

16 ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica

Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 265
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 88
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 1
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☒ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.
14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

VER ANEXO CD

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
2020	2014 5 22	4

Tipo de Radicación: Entrada: X Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14- 110752-	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	**Soporte Documental**
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 10 ARCHIVOS:
10 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS.
EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO (3)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0012364

Bogotá D.C., Febrero 03 de 2014 - 16:41:13

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	12353	03/02/2014		332.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133678	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133679	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133680	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133681	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133682	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133683	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133684	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133685	24/12/2013		505.000.00
RECIBO DE CA	999999999	133686	24/12/2013		505.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	515.000.00	515.000.00
				$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-110752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-22 16:14:07 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4 5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-110752- -00000-0000

Fecha: 2014-05-22 16:14:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 45

5

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	LISTA DE CHEQUEO ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

INMUNOLIGANTES BIESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA TNF E IL-17

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se proporcionan proteínas de unión multiespecíficas y multivalentes diseñadas, métodos de fabricación, y específicamente sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad.

SECTOR: Sector Biotecnológico. Proteínas de unión multi-específicas y multivalentes que unen TNF e IL-17, útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, cáncer, entre otras.

INMUNOLIGANTES BIESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA TNF E IL-17

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama la prioridad a Solicitud provisional de Estados Unidos serie No. 61/550,619, representada el 24 de octubre de 2011, que se incorpora aquí para referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

Proteínas de unión multi-específicas y multivalentes que unen TNF e IL-17, métodos de fabricación y específicamente para su uso en el diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, cáncer y otras enfermedades se proporcionan.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Proteínas diseñadas, tal como proteínas de unión multi-específicas capaces de unir dos o más antígenos son conocidas la técnica. Dichas proteínas de unión multi-específicas pueden generarse utilizando, fusión celular, conjugación química o técnicas de ADN recombinante.

Proteína de unión bi-especifica se han producido utilizando la tecnología de quadroma (véase Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934):537-40) basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes que expresan anticuerpos monoclonales de murina (mAbs) con las especificidades deseadas del anticuerpo bi-específico. Debido al apareamiento aleatorio de dos diferentes cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina (Ig) dentro de la línea celular hibrido-hibridoma resultante (o quadroma), hasta diez diferentes especies Ig se generan, de los cuales sólo uno es un anticuerpo bi-específico funcional. La presencia de subproductos mis-apareados y los rendimientos de producción significativamente reducidos, significa que se requieren procedimientos de

purificación sofisticada.

Proteína de unión bi-específica también puede ser producida por conjugación química de dos diferentes mAbs (véase Staerz et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31). Este método no produce preparación homogénea. Otros métodos han utilizado conjugación química de dos diferentes mAbs o fragmentos de anticuerpos pequeños (véase Brennan et al. (1985) Science 229(4708): 81-3).

Otro método utilizado para producir proteína de unión bi-específica es el acoplamiento de dos anticuerpos parentales con un entrelazador hetero-bifuncional, pero los anticuerpos bi-específicos resultantes sufren de heterogeneidad molecular significante porque la reacción del entrelazador con los anticuerpos parentales no es dirigida de sitio. Para obtener preparaciones más homogéneas de anticuerpos bi-específicos dos diferentes fragmentos Fab se han entrelazado químicamente en sus residuos de cisteína de articulación en una manera dirigida de sitio (véase Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139(7): 2367-75). Pero estos resultados del método en fragmentos Fab'2, no completan una molécula de IgG.

Se ha desarrollado una amplia variedad de otros formatos de anticuerpos bi-específico recombinantes (véase Kriangkum et al. (2001) Biomol. Engin. 18(2): 31-40). Moléculas Fv de cadena sencilla tándem y anticuerpos y varios derivados de los mismos, son los más ampliamente utilizados. Rutinariamente, construcción de estas moléculas se inicia desde dos fragmentos de Fv de cadena sencilla (scFv) que reconocen diferentes antígenos (véase Economides et al. (2003) Nat. Med. 9(1): 47-52). Moléculas de scFv tándem (taFv) representan un formato sencillo simplemente conectando a dos moléculas de scFv con un enlazador de péptido adicional. Los dos fragmentos scFv presentes en estas moléculas de scFv tándem forman enlazadores de péptido adicionales. Varios enlazadores pueden utilizarse para conectar los dos fragmentos scFv y enlazadores con una longitud de hasta 63 residuos (véase Nakanishi et al., (2001) Ann. Rev. Immunol. 19:423-74). Aunque los fragmentos scFv parentales normalmente pueden expresarse en forma soluble en las bacterias, es, sin embargo, a menudo observado que las moléculas de scFv tándem forman

agregados insolubles en bacterias. Por lo tanto, protocolos de replegamiento o el uso de sistemas de expresión de mamíferos se aplican rutinariamente para producir moléculas de scFv tándem solubles. Expresión in vivo por conejos transgénicos y ganado de un scFv tándem contra CD28 y un proteoglicano asociado con melanoma es reportado por Gracie et al., (1999) J. Clin. Invest. 104(10): 1393-401. En esta construcción, las dos moléculas de scFv están conectadas por un enlazador de CH1 y concentraciones de suero de hasta 100 mg/L de anticuerpo bi-específico se obtienen. Se utilizaron diversas estrategias que incluyen las variaciones de la orden de dominio o que usan enlazadores medios con variación de longitud o flexibilidad para permitir la expresión soluble en bacterias. Algunos estudios han reportado la expresión de moléculas de scFv tándem solubles en bacterias (véase Leung et al., (2000) J. Immunol. 164(12): 6495-502; Ito et al., (2003) J. Immunol. 170(9): 4802-9; Karni et al (2002) j Neuroimmunol. 125(1-2): 134-40) utilizando un enlazador Ala3 muy corto o enlazadores ricos en glicina/serina largos. En otro estudio, despliegue de fago de un repertorio de scFv tándem que contiene enlazadores medios al azar con una longitud de 3 o 6 residuos se emplea para enriquecer para aquellas moléculas que se producen en forma soluble y activa en las bacterias. Este método resulta en el aislamiento de una molécula de scFv tándem con un enlazador de residuo de 6 aminoácidos (véase Arndt and Krauss (2003) Methods Mol. Biol. 207:305-21). No está claro si esta secuencia de enlazador representa una solución general a la expresión soluble de moléculas scFv tándem. Sin embargo, este estudio demuestra que el despliegue de fago de moléculas scFv tándem en combinación con mutagénesis dirigida es una poderosa herramienta para enriquecer estas moléculas, que pueden ser expresadas en bacterias en forma activa.

Anticuerpos bi-específicos (Db) utilizan el formato de diacuerpo para la expresión. Diacuerpos se producen a partir de fragmentos scFv al reducir la longitud del enlazador que conecta el dominio VH y VL a aproximadamente 5 residuos (véase Peipp and Valerius (2002) Biochem. Soc. Trans. 30(4): 507-11). Esta reducción de tamaño de enlazador facilita la dimerización de dos cadenas polipeptídicas por el cruce de apareamiento de los dominios VH y VL. Diacuerpos

bi-específicos son producidos por expresión de dos cadenas polipeptídicas con cualquiera de las dos estructuras VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VLB-VHA (configuración VL-VH) dentro de la misma célula. Una gran variedad de diferentes anticuerpos bi-específicos se ha producido en el pasado y la mayoría de ellos se puede expresar en forma soluble en bacterias. Sin embargo, un estudio comparativo demuestra que la orientación de los dominios variables puede influir la expresión y formación de sitios de unión activa (véase Mack et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(15): 7021-5). Sin embargo, la expresión soluble en bacterias representa una importante ventaja sobre moléculas de scFv tándem. Sin embargo, ya que dos cadenas polipeptídicas diferentes se expresan dentro de homodímeros inactivos de célula sencilla pueden ser producidos junto con heterodímeros activos. Esto requiere la implementación de etapas de purificación adicionales con el fin de obtener preparaciones homogéneas de diacuerpos bi-específicos. Un método para forzar la generación de diacuerpos bi-específicos de la producción de diacuerpos con botón en orificio (véase Holliger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14): 6444-8.18). Este método es demostrado por un diacuerpo bi-específico dirigido contra HER2 y CD3. Un botón grande se introduce en el dominio VH intercambiando Val37 con Phe y Leu45 con Trp y un orificio complementario se produce en el dominio VL por mutación de Phe98 a Met y Tyr87 a Ala, en los dominios variables anti-HER2 o anti-CD3. Utilizando este método la producción de diacuerpos bi-específicos puede aumentarse de 72% por el diacuerpo parenteral a más del 90% por el diacuerpo de botón en orificio. Lo importante, rendimientos de producción solamente disminuyen ligeramente como resultado de estas mutaciones. Sin embargo, se observa una reducción en la actividad de unión de antígeno para varios constructos analizados. Así, este método bastante elaborado requiere el análisis de varios constructos con el fin de identificar aquellas mutaciones que producen molécula heterodimérica con actividad de unión inalterada. Además, dicho método requiere modificación mutacional de la secuencia de inmunoglobulina en la región constante, creando así la forma no nativa y no natural de la secuencia de anticuerpo, que puede resultar en inmunogenicidad incrementada, mala estabilidad in vivo, así como

farmacocinéticos indeseables.

Diacuerpos de cadena sencilla (scDb) representan una estrategia alternativa para mejorar la formación de moléculas tipo diacuerpo bi-específico (véase Holliger and Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu et al (1996) Immunotechnology 2(1): 21-36). Diacuerpos de cadena sencilla bi-específicos se producen conectando las dos cadenas polipeptídicas que forma diacuerpo con un enlazador medio adicional con una longitud de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos. En consecuencia, todas las moléculas con un peso molecular correspondiente a diacuerpos de cadena sencilla monoméricos (50-60 kDa) son bi-específicos. Varios estudios han demostrado que diacuerpos de cadena sencilla bi-específicos se expresan en las bacterias en forma soluble y activa con la mayoría de moléculas purificadas presentes como monómeros (véase Holliger and Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45(3-4): 128-30; Wu et al., (1996) Immunotechnol 2(1):21-36; Pluckthun and Pack (1997) Immunotechnol. 3(2): 83-105; Ridgway et al., (1996) Protein Engin. 9(7):617-21). Por lo tanto, diacuerpos de cadena sencilla combinan las ventajas del scFv tándem (todos los monómeros son bi-específicos) y diacuerpos (expresión soluble en bacterias).

Más recientemente han sido fusionados diacuerpos a Fc para generar más moléculas tipo Ig, llamadas di-diacuerpos (véase Lu et al (2004) J. Biol. Chem. 279(4): 2856-65). Además, constructo de anticuerpo multivalente que comprende dos Fab se repite en la cadena pesada de un IgG y capaz de unir cuatro moléculas de antígeno se ha descrito (véase publicación PCT No. WO 0177342 y Miller et al., (2003) J. Immunol. 170(9): 4854-61).

TNF (también conocido como factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor-α de necrosis tumoral, TNF-α y caquectina) es una citoquina involucrada en la regulación de las respuestas inmunes. Juega un papel fundamental en la patología asociada con una variedad de enfermedades que involucran elementos inmunes e inflamatorios, tal como enfermedades autoinmunes, especialmente aquellas asociadas con inflamación. Por lo tanto, las proteínas de unión aquí pueden utilizarse para tratar estos trastornos. También se involucran en los trastornos respiratorios; condiciones inflamatorias y/o

autoinmunes de diversos órganos; tumores o cánceres; y varios tipos de infecciones virales, bacterianas y parasitarias.

Interleuquina-17 (IL-17) es una citoquina secretada por las células T activadas, que actúa como un potente mediador en respuestas inmunes al inducir moléculas de señalización inmunes en varios tejidos para reclutar monocitos y neutrófilos al sitio de la inflamación. Actúa sinérgicamente con TNF para llevar a cabo sus funciones. IL-17 se ha relacionado con muchas enfermedades relacionadas inmunes/autoinmune, incluyendo artritis reumatoide, asma, lupus, rechazo de aloinjertos e inmunidad antitumoral.

Existe una necesidad en la técnica de proteínas de unión multivalentes mejoradas capaces de unirse a TNF. Patente de E.U.A. No. 7,612,181 proporciona una novedosa familia de proteínas de unión capaces de unir dos o más antígenos con alta afinidad, que se llaman proteínas de unión de dominio variable dual (proteína de unión a DVD). Se proporcionan proteínas de unión nuevas que unen TNF.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Se proporcionan proteínas de unión multivalentes capaces de enlace TNF e IL-17. Se proporciona una novedosa familia de proteínas de unión capaces de enlace TNF e IL-17 con alta afinidad.

En una modalidad, proteínas de unión que unen TNF que comprenden una cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica comprende VD1-$(X1)_n$-VD2-C-$(X2)_n$, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, C es un dominio constante, X1 representa un aminoácido o polipéptido, X2 representa una región Fc y n es 0 o 1, se proporcionan. En una modalidad el VD1 y VD2 en la proteína de unión son dominios variables de cadena pesada. En otra modalidad, el dominio variable de cadena pesada es un dominio variable de cadena pesada de murina, un dominio variable de cadena pesada humano, un dominio variable de cadena pesada injertado con CDR, o un dominio variable de cadena pesada humanizado. En aún

otra, modalidad VD1 y VD2 son capaces de unir el mismo antígeno. En otra modalidad VD1 y VD2 son capaces de unir diferentes antígenos. En aún otra modalidad, C es un dominio constante de cadena pesada. En una modalidad, X1 es un enlazador con la salvedad de que X1 no sea CH1. En una modalidad, X1 es un enlazador que comprende la secuencia de aminoácidos AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 4); SAKTTP (SEQ ID NO: 5); RADAAP (SEQ ID NO: 6); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8); RADAAAA(G4S)4 (SEQ ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); AKTTAP (SEQ ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); o GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28). En una modalidad, X2 es una región Fc. En otra modalidad, X2 es una región variante Fc.

En una modalidad la proteína de unión descrita aquí comprende una cadena polipeptídica que une TNF, en donde la cadena polipeptídica compone VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un enlazador con la salvedad de que no es CH1, y X2 es una región Fc.

En una modalidad, VD1 y VD2 en la proteína de unión son dominios variables de cadena ligera. En una modalidad, el dominio variable de cadena ligera es un dominio variable de cadena ligera de murina, un dominio variable de cadena ligera humano, un dominio variable de cadena ligera injertado con CDR, o un dominio variable de cadena ligera humanizado. En una modalidad VD1 y VD2 son

capaces de unir el mismo antígeno. En otra modalidad VD1 y VD2 son capaces de enlazar diferentes antígenos. En una modalidad, C es un dominio constante de cadena ligera. En una modalidad, X1 es un enlazador con la salvedad de que X1 no es CL. En una modalidad, X1 comprende la secuencia de aminoácidos AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2); AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 4); SAKTTP (SEQ ID NO: 5); RADAAP (SEQ ID NO: 6); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8); RADAAAA(G4S)4 (SEQ ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); AKTTAP (SEQ ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); o GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28). En una modalidad, la proteína de unión no comprende X2.

En una modalidad, tanto las cadenas pesadas variables como cadenas ligeras variables comprenden el mismo enlazador. En otra modalidad, las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables comprenden diferentes enlazadores. En otra modalidad, las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables comprenden a un enlazador corto (aproximadamente 6 aminoácidos). En otra modalidad, las cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables comprenden un enlazador largo (más de 6 aminoácidos). En otra modalidad, la cadena pesada variable comprende a un enlazador corto y la cadena ligera variable comprende a un enlazador largo. En otra modalidad, la cadena pesada variable comprende a un enlazador largo y la cadena ligera variable comprende a un enlazador corto.

En una modalidad la proteína de unión descrita aquí comprende una cadena polipeptídica que unen TNF, en donde la cadena polipeptídica comprende

VD1-(X1)n-VD2-C(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio de cadena ligera variable, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un enlazador con la condición de que no sea CL, y X2 no comprende una región Fc.

En otra modalidad, una proteína de unión que une TNF que comprende dos cadenas polipeptídicas, en donde la primera cadena polipéptidica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un primer enlazador, y X2 es una región Fc; y la segunda cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un segundo enlazador, y X2 no comprende una región Fc se proporciona. En algunas modalidades, el primero y segundo X1 son los mismos. En otras modalidades, el primero y segundo X1 son diferentes. En algunas modalidades el primer X1 no es un dominio CH1. En algunas modalidades el segundo X1 no es un dominio CL.

En una modalidad particular, la proteína de unión de dominio de variable Dual (DVD) comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde cada una de las dos primeras cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada, C es un dominio constante de cadena pesada, X1 es un primer enlazador, y X2 es una región Fc; y cada una de las dos segundas cadenas polipeptídicas comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera, C es un dominio constante de cadena ligera, X1 es un segundo enlazador, y X2 no comprende una región Fc. Dicha proteína de unión de DVD tiene cuatro sitios de unión de antígeno. En algunas modalidades, el primero y segundo X1 son los mismos. En otras modalidades, el primero y segundo X1 son diferentes. En algunas modalidades el primer X1 no es un dominio CH1. En algunas modalidades el segundo X1 no es un dominio CL. En otra

modalidad las proteínas de unión descritas aquí son capaces de unir TNF. En consecuencia, en algunas modalidades, las proteínas de unión comprenden por lo menos dos secuencias de dominio variable (por ejemplo, VD1 y VD2) capaces de unir TNF, en cualquier orientación. En algunas modalidades, VD1 y VD2 se eligen de forma independiente. Por lo tanto, en algunas modalidades, VD1 y VD2 comprenden la misma SEQ ID NO y, en otras modalidades, VD1 y VD2 comprenden SEQ ID NOS diferentes.

En una modalidad, la proteína de unión comprende dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2, y dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2, en donde

(a) el dominio variable de cadena pesada VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, 809 o cualquiera de 36-41, 48-72, u 88-97, el dominio variable de cadena ligera VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o alguno de 42-47, 73-87, o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 independientemente comprenden tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, 809, o cualquiera de 36-41, 48-72 u 88-97, los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 comprenden independientemente tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o alguno de 42-47, 73-87 o 98-107, y la proteína de unión es capaz de unir TNF; o

(c) el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, 809, o cualquiera de 36-41, 48-72 u 88-97, y el

dominio variable de cadena pesada VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o alguno de 42-47, 73-87 o 98-107, el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende tres CDrs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, 812; o

(d) el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, 809, o cualquiera de 36-41, 48-72 u 88-97, y el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende tres CDrs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o alguno de 42-47, 73-87 o 98-107, y el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, u 812.

En otra modalidad, la proteína de unión comprende una cadena pesada y una secuencia de cadena ligera como se muestra en el cuadro 1.

En otra modalidad, una proteína de unión que une TNF que comprende una cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno; VD2 es un segundo dominio variable de pesada cadena obtenido de un

segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que puede ser igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un enlazador con la salvedad de que no es CH1, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n está presente o ausente se proporciona. En una modalidad, la región Fc está ausente de la proteína de unión.

En otra modalidad, una proteína de unión que une TNF que comprende una cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que puede ser igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un enlazador con la salvedad de que no es CL, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente se proporciona. En una modalidad (X2)n está ausente de la proteína de unión.

En otra modalidad, la proteína de unión que une TNF comprende primera y segunda cadenas polipeptídicas, en donde la primera cadena polipeptídica compone un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido un primer anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo de origen o su porción de unión del antígeno, que puede ser igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un primer enlazador, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n está presente o ausente; y en donde la segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido de un primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que puede ser

igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un segundo enlazador, en donde el (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n está presente o ausente. En otra modalidad, la proteína de unión comprende dos primeras cadenas polipeptídicas y dos segundas cadenas polipeptídicas. En aún otra modalidad, (X2)n está ausente del segundo polipéptido. En algunas modalidades, el primero y segundo X1 son los mismos. En otras modalidades, el primero y segundo X1 son diferentes. En algunas modalidades el primer X1 no es un dominio CH1. En algunas modalidades el segundo X1 no es un dominio CL. En aún otra modalidad, la región Fc, si está presente en el primer polipéptido, es una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de variante. En aún otra modalidad, la región Fc es una región Fc de un IgG1, una región Fc de un IgG2, una región Fc de un IgG3, una región Fc de un IgG4, una región Fc de un IgA, una región Fc de un IgM, una región Fc de un IgE o una región Fc de un IgD.

En otra modalidad, la proteína de unión que une TNF comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde, la primera y tercera cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido de un primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno; VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido de un segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que puede ser igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un primer enlazador, en donde el (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n está presente o ausente; y en donde la segunda y cuarta cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X 2)n, en donde VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido un primer anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido de un segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que puede ser igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un segundo enlazador, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n está presente o

ausente. En algunas modalidades, el primero y segundo X1 son los mismos. En otras modalidades, el primero y segundo X1 son diferentes. En algunas modalidades el primero X1 no es un dominio CH1. En algunas modalidades el segundo X1 no es un dominio CL.

Se proporciona un método para hacer una proteína de unión que une TNF. En una modalidad, el método para producir una proteína de unión que une IL-13 e IL-17 comprende los pasos de a) obtener un primer anticuerpo de origen, o su porción de unión de antígeno, que une IL-13; b) obtener un segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que une IL-17; c) construir una primera y tercera cadenas polipeptídicas que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada del primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada del segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que puede ser igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un primer enlazador, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente; d) construir la segunda y cuarta cadenas polipeptídicas que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde, VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera del primer anticuerpo de origen su porción de unión de antígeno; VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera del segundo anticuerpo de origen o su unión de antígeno, C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un segundo enlazador, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde (X2)n está presente o ausente; e) expresar la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas; tal que una proteína de unión que se une al primero y segundo antígenos se genera. En algunas modalidades, el primero y segundo X1 son los mismos. En otras modalidades, el primero y segundo X1 son diferentes. En algunas modalidades el primer X1 no es un dominio CH1. En algunas modalidades el segundo X1 no es un dominio CL.

En aún otra modalidad, un método para generar una proteína de unión que une TNF con propiedades deseadas que comprende los pasos de a)

obtener un primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que une TNF y que posee al menos una propiedad deseada exhibida por la proteína de unión; b) obtener un segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que une un segundo antígeno y posee al menos una propiedad deseada exhibida por la proteína de unión; c) construir una primera y tercera cadenas polipeptídicas que comprenden DVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada obtenido del primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada obtenido del segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, que puede ser igual o diferente del primer anticuerpo de origen; C es un dominio constante de cadena pesada; (X1)n es un primer enlazador, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n es una región Fc, en donde el (X2)n está presente o ausente; d) construir la segunda y cuarta cadenas polipeptídicas que comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde; VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera obtenido del primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera obtenido del segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, C es un dominio constante de cadena ligera; (X1)n es un segundo enlazador, en donde (X1)n está presente o ausente; y (X2)n no comprende una región Fc, en donde el (X2)n está presente o ausente; e) expresar la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas polipeptídicas; tal que una inmunoglobulina de dominio variable dual capaz de unir el primero y segundo antígenos con propiedades deseadas se proporciona. En algunas modalidades, el primero y segundo X1 son los mismos. En otras modalidades, el primero y segundo X1 son diferentes. En algunas modalidades el primero X1 no es un dominio CH1. En algunas modalidades el segundo X1 no es un dominio CL.

En una modalidad, el VD1 de la primera y segunda cadenas polipeptídicas descritas aquí se obtienen del mismo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno. En otra modalidad, el VD1 de la primera y segunda cadenas polipeptídicas descritas aquí se obtienen de diferentes anticuerpos de origen o sus porciones de unión de antígeno. En otra modalidad, el VD2 de la

primera y segunda cadenas polipeptídicas descritas aquí se obtienen del mismo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno. En otra modalidad, el VD2 de la primera y segunda cadenas polipeptídicas descritas aquí se obtienen de diferentes anticuerpos de origen o sus porciones de unión de antígeno.

En una modalidad el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, y el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno son el mismo anticuerpo. En otra modalidad el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, y el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, son diferentes anticuerpos.

En una modalidad el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, une un primer antígeno y el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, une un segundo antígeno. En una modalidad particular, el primero y segundo antígenos son el mismo antígeno. En otra modalidad, los anticuerpos de origen unen diferentes epítopes en el mismo antígeno. En otra modalidad el primero y segundo antígenos son antígenos diferentes. En otra modalidad, el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, une el primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con la que el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, une el segundo antígeno. En aún otra modalidad, el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, une el primer antígeno con una diferente afinidad con la que el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, une el segundo antígeno.

En otra modalidad el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, y el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, son un anticuerpo humano, anticuerpo injertado con CDR o anticuerpo humanizado. En una modalidad, las porciones de unión de antígeno son un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de articulación, un fragmento Fd, que consiste de los dominios VH y CH1, un fragmento Fv que consistente de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb, una región de determinación de complementariedad aislada

(CDR), un anticuerpo de cadena sencilla o diacuerpos.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de unión a IL-17 que comprende al menos una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende

(a) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811; o

(b) cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811.

En una modalidad, la invención proporciona una proteína de unión a IL-17 que comprende al menos una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende

(a) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812; o

(b) cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812.

En una modalidad, la invención proporciona una proteína de unión a IL-17 que comprende al menos una región variable de cadena pesada (región VH) y al menos una región variable de cadena ligera (región VL) donde la región VH comprende:

(a) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y

811; o

(b) cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811; y

la región VL comprende:

(c) tres CDR de cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812; o

(d) cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812.

En una modalidad, la proteína de unión comprende dos regiones VH y dos regiones VL.

En una modalidad, la proteína de uníón comprende al menos una región VH y al menos una región VL que comprende un conjunto de secuencias de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 30 y 31; 32 y 33; 34 y 35; 108 y 118; 108 y 119; 109 y 116; 110 y 117; 111 y 120; 112 y 117; 113 y 120; 114 y 117; 115 y 117; 527 y 537; 527 y 538; 528 y 535; 529 y 536; 530 y 539; 531 y 536; 532 y 539; 533 y 536; y 534 y 536.

En una modalidad, donde la proteína de unión:

(a) modula una función biológica de IL-17;

(b) neutraliza IL-17;

(c) disminuye la capacidad de IL-17 de unirse a su receptor;

(d) disminuye la capacidad de IL-17 pro-humana, IL-17 humana madura, o IL-17 humana truncada de unirse a su receptor; y/o

(e) reduce uno o más de la producción de citocina dependiente de Il-17, destrucción celular dependiente de IL-17, inflamación dependiente de IL-17, erosión de los huesos dependiente de IL-17 y el daño a los cartílagos dependiente de IL-17.

En una modalidad, donde la proteína de unión tiene una constante de

velocidad de asociación (Kasoc) de al menos alrededor de $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos alrededor de $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos alrededor de $10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos alrededor de $10^5M^{-1}s^{-1}$; o al menos alrededor de $10^6M^{-1}s^{-1}$, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales.

En una modalidad, la proteína tiene una constante de velocidad de disociación (Kdisoc) de como máximo alrededor de $10^{-3}s^{-1}$; como máximo alrededor de $10^{-4}s^{-1}$; como máximo alrededor de 10^{-5}s-1; o como máximo alrededor de $10^{-6}s^{-1}$, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales.

En una modalidad, la proteína de unión tiene una constante de disociación (KD) de como máximo alrededor de 10^{-7} M; como máximo alrededor de 10^{-8} M; como máximo alrededor de 10^{-9} M; como máximo alrededor de 10^{-10} M; como máximo alrededor de 10^{-11} M; como máximo alrededor de 10^{-12} M; o como máximo de 10^{-13} M.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de unión capaz de unirse a IL-17 humana, la proteína de unión comprende:

(a) una región constante de cadena pesada;

(b) una región constante de cadena ligera;

(c) una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811; y

(d) una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812.

En otra modalidad la proteína de unión posee al menos una propiedad deseada exhibida por el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno, o el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno. Alternativamente, el primer anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno y el segundo anticuerpo de origen o su porción de unión de antígeno

poseen al menos una propiedad deseada exhibida por la inmunoglobulina de dominio Variable Dual. En una modalidad, la propiedad deseada es uno o más parámetros de anticuerpo. En otra modalidad, los parámetros de anticuerpos son especificidad de antígeno, afinidad a antígeno, potencia, función biológica, reconocimiento del epítope, estabilidad, solubilidad, eficacia de producción, inmunogenicidad, farmacocinéticas, biodisponibilidad, reactividad cruzada de tejido o unión de antígeno ortólogo. En una modalidad la proteína de unión es multivalente. En otra modalidad, la proteína de unión es multi-específica. Las proteínas de unión multivalentes o multi-específicas descritas aquí tienen propiedades deseables especialmente desde un punto de vista terapéutico. Por ejemplo, la proteína de unión multivalente y/o multiespecífica puede (1) ser interiorizada (y/o catabolizada) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno a la que los anticuerpos se unen; (2) ser un anticuerpo agonista; y/o (3) inducir la muerte celular y/o apoptosis de la célula que expresa un antígeno que el anticuerpo multivalente es capaz de unir a. El "anticuerpo de origen" que proporciona al menos una especificidad de unión de antígeno de las proteínas de unión multivalentes y/o multi-específicas puede ser uno que es internalizado (o catabolizado) por una célula que expresa un antígeno al que se une el anticuerpo; y/o puede ser un agonista, anticuerpo que induce apóptosis y/o que induce la muerte celular, y la proteína de unión multivalente y/o multiespecífica como se describe en este documento puede desplegar mejora(s) en una o más de estas propiedades. Además, el anticuerpo de origen puede carecer de uno o más de estas propiedades, pero puede ser dotado con ellas cuando se construya como una proteína de unión multivalente descrita en este documento.

En otra modalidad la proteína de unión tiene una constante de velocidad de asociación (K_{asoc}) para uno o más objetivos de: por lo menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; o al menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial. En una modalidad, la proteína de unión tiene una constante de velocidad de

asociación (K_{asoc}) para uno o más objetivos entre aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; entre aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; entre aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; o entre aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$ y aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial.

En otra modalidad, la proteína de unión tiene una constante de velocidad de disociación (K_{disoc}) para uno o más objetivos de: como máximo aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a mas de aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; a más de aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; o a más de aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial. En una modalidad, la proteína de unión tiene constante de velocidad de disociación (K_{disoc}) para uno o más objetivos de aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$ a aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; de aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$ a aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; o de aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$ a aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, como se mide por resonancia de plasmón superficial.

En otra modalidad, la proteína de unión tiene una constante de disociación (KD) para uno o más objetivos de: más de aproximadamente 10^{-7}M; a más de aproximadamente 10^{-8}M; a más de aproximadamente 10^{-9}M; a más de aproximadamente 10^{-10}M; a más de aproximadamente 10^{-11}M; a más de aproximadamente 10^{-12}M; o a más de 10^{-13}M. En Modalidad, la proteína de unión tiene una constante de disociación (KD) para sus objetivos de aproximadamente 10^{-7}M a aproximadamente 10^{-8}M; de aproximadamente 10^{-8}M a aproximadamente 10^{-9}M; de aproximadamente 10^{-9}M a aproximadamente 10^{-10}M; de aproximadamente 10^{-10}M a aproximadamente 10^{-11}M; de aproximadamente 10^{-11}M a aproximadamente 10^{-12}M; o de aproximadamente 10^{-12} a aproximadamente 10^{-13}M.

En otra modalidad, la proteína de unión descrita aquí es un conjugado que comprende adicionalmente un agente. En otra modalidad, el agente es una molécula de inmuno-adhesión, un agente de formación de imágenes, un agente terapéutico, o un agente citotóxico. En una modalidad, el agente de formación imágenes es un radioetiquetado, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta bioluminiscente, una etiqueta magnética o una

biotina. En otra modalidad, el radioetiquetado es: ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, o ^{153}Sm. En aún otra modalidad, el agente terapéutico o citotóxico es un anti-metabolito, un agente de alquilación, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citoquina, un agente anti-angiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, toxina o un agente apoptótico.

En otra modalidad, la proteína de unión descrita aquí es una proteína de unión cristalizada y existe como un cristal. En una modalidad, el cristal es un cristal de liberación controlada farmacéutico libre de portador. En aún otra modalidad, la proteína de unión cristalizada tiene una mayor vida media in vivo que la contraparte soluble de la proteína de unión. En todavía otra modalidad, la proteína de unión cristalizada mantiene actividad biológica.

En otra modalidad, la proteína de unión descrita aquí es glicosilada. Por ejemplo, la glicosilación es un patrón de glicosilación humana.

También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica alguna de las proteínas de unión descritas aquí. Una modalidad adicional proporciona un vector que comprende el ácido nucleico aislado descrito aquí en donde el vector es pcDNA; pTT (Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30(2); pTT3 (pTT con sitio de clonación múltiple adicional; pEFBOS (Mizushima and Nagata (1990) Nucleic Acids Res. 18(17);pBV; pJV; pcDNA3.1 TOPO; pEF6 TOPO; pBOS-hCγ1, pHybE o pBJ. En una modalidad, el vector es un vector descrito en Publicación de Patente de E.U.A. No. 20090239259.

En otro aspecto una célula hospedera se transforma con el vector descrito aquí. En una modalidad, la célula hospedera es una célula procariota. En otra modalidad, la célula hospedera es E. coli. En una modalidad relacionada con la célula hospedera es una célula eucariota. En otra modalidad, la célula eucariota es una célula protista, una célula animal, una célula vegetal, o una célula fúngica. En aún otra modalidad, la célula hospedera es una célula de mamífero incluyendo pero sin limitarse a, CHO, COS; NS0, SP2, POR.C6 o una célula fúngica, tal como Saccharomyces cerevisiae o una célula de insecto, tal como Sf9.

En una modalidad, dos o más, por ejemplo, con diferentes especificidades, se producen en una célula hospedera recombinante sencilla. Por

ejemplo, la expresión de una mezcla de anticuerpos ha sido llamada Oligoclonics™, (Merus B.V., Países Bajos) Patente de E.U.A. Nos. 7,262,028; 7,429,486.

Un método de producción de una proteína de unión descrita aquí que comprende el cultivo de cualquiera de las células hospederas también descritas aquí en un medio de cultivo en condiciones suficientes para producir la proteína de unión se proporciona. En una modalidad, 50%-75% de la proteína de unión producida por este método es una proteína de unión tetravalente específica dual. En una modalidad particular, 75-90% de la proteína de unión producida por este método es una proteína de unión tetravalente específica dual. En una modalidad particular, 90%-95% de la proteína de unión producida es una proteína de unión tetravalente específica dual.

Una modalidad proporciona una composición para la liberación de una proteína de unión en donde la composición comprende una formulación que a su vez comprende una proteína de unión cristalizada, como se describe aquí y un ingrediente y al menos un portador polimérico. Por ejemplo, es el portador polimérico es: poli(ácido acrílico), poli(cianoacrilatos), poli(aminoácidos), poli(anhídridos), poli(depsipéptido), poli(ésteres), poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico) o PLGA, poli(b-hidroxibutirato), poli(caprolactona), poli(dioxanona); poli(etilenglicol), poli(hidroxipropil)metacrilamida, poli[(organo)fosfazeno], poli(ortoésteres), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpirrolidona), copolímeros de alquil vinil éter anhídrido maléico, polioles pluronico, albúmina, alginato, celulosa y derivados de celulosa, colágeno, fibrina, gelatina, ácido hialurónico, oligosacáridos, glicaminoglicanos, polisacáridos sulfatados, o mezclas y sus copolímeros. Por ejemplo, el ingrediente puede ser albúmina, sacarosa, trehalosa, lactitol, gelatina, hidroxipropil-β-ciclodextrina, metoxipolietilenglicol o polietilenglicol. Otra modalidad proporciona un método para el tratamiento de un mamífero que comprende el paso de la administración al mamífero de una cantidad efectiva de la composición descrita aquí.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión, como se describe aquí y un portador farmacéuticamente

aceptable. En una modalidad adicional la composición farmacéutica comprende al menos un agente terapéutico adicional para tratar un trastorno. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico, un agente de formación de imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de angiogénesis (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo anti-VEGF o un VEGF-trap), un inhibidor de quinasa (incluyendo pero no limitado a un KDR y un inhibidor de TIE-2), un bloqueador de molécula de co-estimulación (incluyendo pero no limitado a anti-B7.1, anti-B7.2, CTLA4-Ig, anti-CD20), un bloqueador de molécula de adhesión (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo anti-ALF-1, un anticuerpo de selectiva anti-E/L, un inhibidor de molécula pequeña), un anticuerpo anti-citoquinas o su fragmento funcional (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo del receptor anti-IL-18, anti-TNF y anti-IL-6/citoquinas), metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una etiqueta detectable o reportero, un antagonista TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriático, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo, una citoquina o un antagonista de citoquina.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que sufre de un trastorno en el que el objetivo, u objetivos, capaces de ser enlazados por la proteína de unión descrita aquí es perjudicial, que comprende la administración al sujeto humano de una proteína de unión descrita aquí tal que la actividad del objetivo, u objetivos en el sujeto humano se inhibe y uno o más síntomas se alivian o el tratamiento se consigue se proporciona. En una modalidad, enfermedades que pueden ser tratadas o diagnosticadas con las composiciones y métodos incluyen, pero no se limitan a, elementos inmunes e inflamatorios, tal como enfermedades autoinmunes, particularmente aquellas asociadas con inflamación, que incluyen la enfermedad de Crohn, psoriasis (que incluyen psoriasis de placa), artritis

(incluyendo artritis reumatoide, artritis psoratica, osteoartritis o artritis idiopática juvenil), esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, artropatía espondilitis, lupus eritematoso sistémico, uveitis esclerosis múltiple, sepsis y enfermedades neurodegenerativas, regeneración neuronal, lesiones de la médula espinal y cánceres primarios y metastásicos. En otra modalidad, el trastorno es un trastorno respiratorio; asma; asma alérgica y no alérgica; asma debido a una infección; asma debido a una infección con el virus sincitial respiratorio (RSV); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una afección que involucra inflamación de las vías respiratorias; eosinofilia; la fibrosis y la producción de exceso de moco; fibrosis quística; fibrosis pulmonar; un trastorno atópico; dermatitis atópica; urticaria; eczema; rinitis alérgica; enterogastritis alérgica; una condición autoinmune y/o inflamatoria de la piel; una condición autoinmune y/o inflamatoria de los órganos gastrointestinales; enfermedades inflamatorias intestinales (IBD); colitis ulcerativa; enfermedad de Chrohn; una condición inflamatoria y/o autoinmune del hígado; cirrosis hepática; fibrosis hepática; fibrosis hepática causada por el virus de hepatitis B y/o C; esclerodermia; tumores o cánceres; carcinoma hepatocelular; glioblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; una infección viral; una infección bacteriana; una infección parasitaria; infección por HTLV-1; supresión de la expresión de respuestas inmunes tipo I de protección, y la supresión de la expresión de una respuesta inmune tipo 1 protectora durante la vacunación.

En una modalidad, los anticuerpos o sus porciones de unión de antígeno, se utilizan para tratar el cáncer o en la prevención o la inhibición de metástasis de los tumores descritos aquí ya sea cuando se usan solos o en combinación con radioterapia y/u otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto un método para tratar un paciente que padece de un trastorno que comprende el paso de la administración de una de las proteínas de unión descritas aquí antes, simultáneamente o después de la administración de un segundo agente, como se describe en este documento se proporciona. En una modalidad particular el segundo agente es budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-

mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor IL-1, mAbs anti-IL-1β, mAbs del receptor anti-IL-6 o IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos o agonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, NSAIDs, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adensosina, agentes anti-trombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de quinasa MAP, inhibidores enzimáticos de conversión de IL-1β, inhibidores de enzima de conversión de TNFα, inhibidores de señalización de células T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima de conversión de angiotensina, receptores de citoquinas solubles, receptor de TNF p55 soluble, receptor de TNF p75 soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citoquinas anti-inflamatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, o TGFβ. En una modalidad particular las composiciones farmacéuticas descritas aquí son administradas al paciente por administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabroquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelial, intercereberal, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapelvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intra-rectal, intra-renal, intra-retiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica. Al menos un anticuerpo anti-idiotipo para al menos una proteína de unión también se proporciona. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier proteína o péptido que contiene la molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina tal como, pero no limitado a, al menos una región de determinación complementariamente (CDR) de una cadena pesada o ligera o su porción de unión de ligando, una región variable de cadena ligera o cadena

pesada, una región constante de cadena ligera o cadena pesada, una región de marco, o cualquier porción de la misma, que puede ser incorporada en una proteína de unión provista aquí.

Se proporciona un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de TNF (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El método comprende ensayar la muestra de prueba para el antígeno (o un fragmento del mismo) por un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una etiqueta detectable y (ii) comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba a una señal generada como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en un control o un calibrador. El calibrador es opcionalmente parte de una serie de calibradores en que cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores en la serie por la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de al menos una proteína de unión comprende la proteína de unión, tal como la proteína de unión a DVD, descrita aquí. El método puede comprender (i) poner en contacto con la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) para formar un agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), (ii) poner en contacto con el agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) complejo con al menos un agente de detección, que comprende una etiqueta detectable y se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) que no esté enlazado por el agente de captura, para formar un agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/complejo de agente de detección y (iii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba basada en la señal generada por la etiqueta detectable en el agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo)/complejo de agente de detección formado en (ii), en donde al menos una agente de captura y/o al menos un agente de detección es al menos una proteína de unión.

Alternativamente, el método puede comprender (i) poner en contacto

la muestra de prueba con al menos un agente de captura, que se une a un epítope en el antígeno (o un fragmento del mismo) para formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo), y simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de prueba con antígeno etiquetado detectablemente (o un fragmento del mismo), que puede competir con cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba para unir a la menos un agente de captura, en donde cualquier antígeno (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de prueba y el antígeno etiquetado detectablemente compiten entre sí para formar un complejo de agente de captura/antígeno (o un fragmento del mismo) y un complejo de agente de captura/antígeno etiquetado detectablemente (o un fragmento del mismo), respectivamente, y (ii) determinar la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba basada en la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno etiquetado detectablemente (o un fragmento del mismo) formado en (ii), en donde al menos un agente de captura es al menos una proteína de unión y en donde la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de agente de captura/antígeno etiquetado detectablemente (o un fragmento del mismo) es inversamente proporcional a la cantidad o concentración de antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba.

En algunas modalidades, los métodos descritos aquí comprenden analizar la muestra de prueba para el antígeno (o un fragmento del mismo) por un inmunoensayo. El inmunoensayo (i) emplea al menos una proteína de unión y al menos una etiqueta detectable y (ii) comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba a una señal generada como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración del antígeno (o un fragmento del mismo) en un control o un calibrador. El calibrador es opcionalmente parte de una serie de calibradores en que cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores de la serie por la concentración del antígeno (o un fragmento del mismo). Una de al

menos una proteína de unión comprende la proteína de unión, tal como la proteína de unión a DVD, descrita aquí.

Si la muestra de prueba es de un paciente, los métodos descritos aquí pueden comprender además diagnosticar, pronosticar, o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente. Si los métodos además comprenden evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, los métodos opcionalmente comprenden además modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. Los métodos descritos en este documento pueden ser adaptados para su uso en un sistema automatizado o sistema semi-automatizado.

También se proporciona un kit para análisis de una muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo). El kit comprende al menos un componente para análisis de la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) e instrucciones para el análisis de la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo), en donde al menos un componente incluye al menos una composición que comprende una proteína de unión descrita aquí.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1A es una representación esquemática de constructos de dominio variable dual (DVD) y muestra la estrategia para la generación de una proteína de unión a DVD de dos anticuerpos de origen.

Figura 1B es una representación esquemática de constructos DVD1-Ig, DVD2-Ig y dos clones de anticuerpo mono-específicos quiméricos.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan proteínas de unión multivalentes y/o multiespecíficas capaces de unir dos o más antígenos. Proteínas de unión de dominio variable (proteínas de unión a DVD) y sus composiciones farmacéuticas, así como ácidos

nucleicos, vectores de expresión recombinante y las células hospederas para producir dichas proteínas de unión a DVD. También se proporcionan métodos para usar las proteínas de unión a DVD para detectar antígenos específicos, tanto in vitro como in vivo.

A menos que se defina lo contrario aquí, términos científicos y técnicos utilizados aquí tienen los significados que son comúnmente entendidos por aquellos de experiencia ordinaria en la técnica. En caso de cualquier ambigüedad latente, definiciones establecidas aquí toman precedente sobre cualquier definición de diccionario o extrínseca. A menos que el contexto requiera lo contrario, términos singulares incluirán pluralidades y términos plurales que incluyen el singular. El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso del término "que incluye", así como de otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Términos como "elemento" o "componente" incluyen ambos elementos y componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad a menos que se indique específicamente lo contrario.

Generalmente, nomenclaturas utilizadas en relación con el cultivo celular y de tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genéticas y proteínas y química de ácido nucleico e hibridación descritos aquí son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Los métodos y técnicas establecidas aquí por lo general se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien sabidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas a lo largo de la presente especificación a menos que se indique lo contrario. Reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, normalmente realizadas en la técnica o como se describe en este documento. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descrita aquí son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Técnicas estándares se utilizan para la síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y

suministro y tratamiento de pacientes.

Para que la descripción pueda ser más fácilmente entendida, los términos seleccionados se definen a continuación.

El término "anticuerpo" se refiere ampliamente a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig) conformada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o su derivación, que retiene las características de unión de epítope esencial de una molécula Ig. Dicho formatos de anticuerpo mutante, variante o derivados son conocidos en la técnica, y modalidades no limitantes de los mismos se discuten en este documento.

En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden ser subdivididas en las regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones de determinación de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas de amino amino-termino a carboxi-termino en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

El término "Región Fc" se utiliza para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que puede ser generada por digestión de papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una la región Fc variante. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3 y opcionalmente comprende un dominio CH4. Sustituciones de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora de anticuerpos son

conocidas en la técnica (Patente US No. 5,648,260 y 5,624,821). La porción Fc del anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citoquinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y vida media/tasa de aclaramiento de complejos de anticuerpo y antígeno-anticuerpo. En algunos casos estas funciones efectoras son deseables para un anticuerpo terapéutico, pero en otros casos podrían ser innecesarias o incluso perjudiciales, dependiendo de los objetivos terapéuticos. Algunos isotipos IgG humanos, particularmente IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC a través del enlace a FcγRs y C1q de complemento, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media de circulación de anticuerpos. En todavía otra modalidad, al menos un residuo de aminoácido se sustituirá en la región constante del anticuerpo, por ejemplo la región Fc del anticuerpo, tal que las funciones efectoras del anticuerpo se alteran. La dimerización de dos cadenas pesadas idénticas de una inmunoglobulina es mediada por la dimerización de dominios CH3 y está estabilizado por enlaces de disulfuro dentro de la región de articulación (Huber et al., (1976) Nature 264:415-20; Thies et al (1999) J. mol Biol. 293:67-79). Mutación de residuos de cisteína dentro de las regiones de articulación para evitar los enlaces de disulfuro de cadena pesada-cadena pesada desestabilizarán la dimeración de dominios CH3. Se han identificado residuos responsables de la dimerización de CH3 (Dall'Acqua (1998) Biochem. 37:9266-73.). Por lo tanto, es posible generar una mitad-Ig monovalente. Curiosamente, estas moléculas Ig medias monovalentes se han encontrado en la naturaleza para subclases de IgG e IgA (Seligman (1978) Ann. Immunol. 129:855-70; Biewenga et al., (1983) Clin. Exp. Immunol. 51:395-400). La estequiometría de FcRn: región Fc de Ig se ha determinado que es 2:1 (West et al., (2000) Biochem. 39:9698-708), y media Fc es suficiente para mediar el enlace FcRn (Kim et al., (1994) Eur. J. Immunol. 24:542-548.). Mutaciones para interrumpir la dimerización de dominio CH3 no tienen mayor efecto adverso sobre su unión de FcRn como los residuos importantes para dimerización CH3 se encuentran en la interfaz interna de la estructura de hoja de CH3 b, mientras que la región responsable de unión de FcRn se encuentra en la interfaz exterior de

dominios CH2-CH3. Sin embargo, la molécula Ig media puede tener ciertas ventajas en penetración de tejido debido a su tamaño más pequeño que el de un anticuerpo regular. En una modalidad al menos un residuo de aminoácido se sustituirá en la región constante de las proteínas de unión provista aquí, por ejemplo la región Fc, tal que se interrumpe la dimerización de las cadenas pesadas, resultando en moléculas de proteína de unión a DVD. La actividad anti-inflamatoria de IgG es dependiente de la sialilación de glican N-enlazado del fragmento Fc de IgG. Los requerimientos de glican precisos para actividad anti-inflamatoria han sido determinados, tal que puede crearse un fragmento Fc de IgG1 apropiado, con lo cual se genera un IgG1 sialilada, completamente recombinante con potencia incrementada grandemente (Anthony et al., (2008) Science 320:373-376).

El término "porción de unión de antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o varios fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unir específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que se puede realizar la función de unión de antígeno de un anticuerpo por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Dichas modalidades de anticuerpo también pueden ser formatos bi-específicos, específicos duales o multi-específicos; unión específicamente a dos o más antígenos diferentes. Ejemplos de enlace fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión de antígeno" de un anticuerpo incluye (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios de VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de articulación; (iii) un fragmento Fd consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv consistente de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al (1989) Nature 341:544-546, Publicación PCT No. WO 90/05144), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región de determinación de complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes independientes, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite hacer como una cadena de proteína única en la que el par de regiones VL

y VH formen moléculas monovalentes (conocidas como cadena sencilla Fv (scFv); véase por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla pretenden ser incluidos dentro del término "porción de unión de antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencillas, tal como diacuerpos. Diacuerpos son anticuerpos bi-específicos bivalentes en qué dominios VH y VL se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, con lo cual obliga a los dominios aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión del antígeno (véase por ejemplo, Holliger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al (1994) Structure 2:1121-1123). Dichas porciones de unión de anticuerpo son conocidas en la técnica (Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 pp (ISBN 3-540-41354-5). Además anticuerpos de cadena sencilla también incluyen "anticuerpos lineales", que comprenden un par de segmentos de Fv tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión del antígeno (Zapata et al (1995) Proteín Eng. 8(10): 1057-1062; y Patente de Estados Unidos No. 5,641,870).

El término “proteína de unión multivalente” se utiliza a través de esta especificación para denotar una proteína de unión que comprende dos o más sitios de unión de antígeno. En una modalidad, la proteína de unión multivalente está diseñada para tener tres o más sitios de unión de antígeno y no es generalmente un anticuerpo de origen natural. El término "proteína de unión multiespecífica" se refiere a una proteína de unión capaz de unir dos o más objetivos relacionadas o no relacionados. Proteínas de unión de dominio variable dual (DVD) proporcionadas aquí comprenden dos o más sitios de unión de antígeno y son proteínas de unión tetravalentes o multivalentes. Proteínas de unión a DVD pueden ser monoespecíficas, es decir, capaces de unir un antígeno o multiespecífico, es decir, capaces de unir dos o más antígenos. Proteínas de unión a DVD que comprenden dos polipéptidos DVD de cadena pesada y dos polipéptidos DVD de

cadena ligera se conocen como DVD. Cada mitad de una proteína de unión a DVD comprende un polipéptido DVD de cadena pesada y un polipéptido DVD de cadena ligera y dos sitios de unión de antígeno. Cada sitio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera con un total de 6 CDRs involucrados en la unión de antígeno por sitio de unión de antígeno.

El término "anticuerpo bi-específico" se refiere a anticuerpos de longitud completa generados por la tecnología de quadroma (véase Milstein and Cuello (1983) Nature 305(5934): 537-40), por conjugación química de dos anticuerpos monoclonales diferentes (véase Staerz et al. (1985) Nature 314(6012): 628-31), o por métodos de botón el orificio o similares que introduce mutaciones en la región Fc (véase Holliger et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(14): 6444-6448), resultando en múltiples especies de inmunoglobulina diferentes de los cuales sólo uno es el anticuerpo biespecífico funcional. Por función molecular, un anticuerpo biespecífico une a un antígeno (o epítope) en uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC) y une a un antígeno diferente (o epítope) en su segundo brazo (un par diferente de HC/LC). Por esta definición, un anticuerpo bi-específico tiene dos brazos de unión de antígeno distintos (en especificidad y secuencias de CDR) y es monovalente para cada antígeno al cual se une.

El término "anticuerpo específico dual" se refiere a anticuerpos de longitud completa que se pueden unir a dos antígenos diferentes (o epítopes) en cada uno de sus dos brazos de unión (un par de HC/LC) (véase la publicación PCT No. WO 02/02773). En consecuencia, una proteína de unión específica dual tiene dos brazos de unión de antígeno idénticos, con especificidad idéntica y secuencias de CDR idénticas y es bivalente para cada antígeno al que se une.

Un "sitio de unión de antígeno funcional" de una proteína de unión es uno que es capaz de unir un antígeno objetivo. La afinidad de unión de antígeno del sitio de unión de antígeno no es necesariamente tan fuerte como el anticuerpo de origen del cual el sitio de unión de antígeno se deriva, pero la capacidad de unir el antígeno puede medirse utilizando cualquiera de una variedad de métodos conocidos para la evaluación de unión de anticuerpo a un antígeno. Además, la afinidad de unión de antígeno de cada uno de los sitios de unión de antígeno de un

anticuerpo multivalente aquí no necesita ser cuantitativamente el mismo.

El término "enlazador" se utiliza para denotar polipéptidos que comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces de péptido y se utiliza para unir una o más porciones de unión de antígeno. Dichos polipéptidos de enlazador son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Holliger et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al (1994) Structure 2:1121-1123).

Un “dominio constante de inmunoglobulina” se refiere a un dominio constante de cadena pesada o ligera. Secuencias de aminoácido de dominio constante de cadena ligera y cadena pesada IgG humana son conocidas en la técnica.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para mutaciones de origen natural posibles que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un antígeno único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que usualmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada mAb se dirige contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" no es debe construir como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular.

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos provistos aquí pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en el CDR y en CDR3 particular. Sin embargo, el término "anticuerpo humano" no incluye anticuerpos en los cuales secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especies de mamíferos, tal como un ratón, han sido injertada sobre

secuencias marco humano.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que están preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tal como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpo humano combinatorial recombinante (Hoogenboom H.R. (1997) TIB Tech. 15:62-70; Azzazy H., y Highsmith W.E. (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V., y Larrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H., y Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, Taylor, L. D., et al. Nucl (1992). Acid res. 20:6287-6295; Kellermann S-A. y Green L.L. (2002) Current Opinion in biotechnology 13:593-597; Little et al (2000) Immunology Today 21:364-370) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica dividir secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, dichos anticuerpos recombinantes humanos son sometidos a mutagénesis in vitro (o, cuando un animal transgénico para secuencias Ig humanas se usa, mutagénesis somática in vivo) y así las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras se derivan y relacionan con las secuencias VH y VL de línea germinal humana, naturalmente no pueden existir dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpo humano in vivo.

Un anticuerpo "madurado de afinidad" es un anticuerpo con una o más alteraciones en uno o varios de sus CDRs que resulta en una mejora en la afinidad del anticuerpo para antígeno, en comparación con un anticuerpo de origen que no posee estas alteraciones. Anticuerpos madurados de afinidad ejemplares tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Anticuerpos madurados de afinidad son producidos por procedimientos conocidos

en la técnica. Marks et al. (1992) BioTechnology 10:779-783 describe la maduración de afinidad por transposiciones de dominio VH y VL. Mutagénesis aleatoria de CDR y/o residuos de marco es descrito por: por ejemplo, Barbas et al. (1994) Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 y mutación selectiva en posiciones de mutagénesis selectiva, contacto o posiciones de hipermutación con una actividad que incrementa residuos de aminoácidos como se describe en Patente de E.U.A. No. 6,914,128.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de una especie y secuencias de región constante de otras especies, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera de murina enlazadas a regiones constantes humanas.

El término "anticuerpo injertado con CDR" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de una especie, pero en el cual las secuencias de una o más de las regiones CDR de VH y/o VL son reemplazadas con secuencias CDR de otras especies, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena ligera y pesada en la que una o más de CDRs de murina (por ejemplo CDR3) se han reemplazado con secuencias CDR humanas.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena ligera y pesada de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en la cual al menos una porción de la secuencia VH y/o VL ha sido alterada por ser más "tipo-humano", es decir, más similar a las secuencias variables de línea germinal humana. Un tipo de anticuerpo humanizado es un anticuerpo injertado con CDR, en cuyas las secuencias CDR humanas se introducen en secuencias VH y VL no humanas para reemplazar las secuencias CDR no humanas correspondientes. También "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o su fragmento que une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región de marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y un CDR que tiene sustancialmente la

secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. El término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende substancialmente todos de al menos uno, y usualmente dos, dominios variables (Fab, Fab', $F(ab')_2$, FabC, Fv) en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donador) y todas o substancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En una modalidad, un anticuerpo humanizado comprende también al menos una porción de una región Fc de inmunoglobulina, normalmente de una inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera así como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, articulación, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena ligera humanizada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado sólo contiene una cadena pesada humanizada. En modalidades específicas, un anticuerpo humanizado sólo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "etiquetado de Kabat" se usan indistintamente en este documento. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir hipervariables) diferentes de otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo, o su porción de unión de antígeno (Kabat et al., (1971) Ann. NY Acad., Sci. 190:382-391 y, Kabat, E.A., et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable varía de posiciones 31 a 35 de aminoácido para CDR1, posiciones 50 a 65 de aminoácido para CDR2, y posiciones 95-102 de aminoácido

para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía de posiciones de aminoácido 24 a 34 para CDR1, posiciones de aminoácido 50 a 56 para CDR2 y posiciones de aminoácido 89 a 97 para CDR3.

El término "CDR" se refiere a la región de determinación de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpo. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que son designadas CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres CDRs que ocurre en una región variable sencilla capaz de unir el antígeno. Se han definido los límites exactos de estos CDRs diferentes de acuerdo con diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) no sólo proporciona un residuo inequívoco que numera el sistema aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, pero también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDRs. Estas CDRs pueden ser referidas como para CDRs de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883) encuentra que ciertas sub-porciones dentro de CDRs de Kabat adoptan conformaciones de cadena principal de péptido casi idénticas, a pesar de tener gran diversidad en el nivel de secuencia de aminoácidos. Estas sub-porciones se designan como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la “L” y la “H” designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden referirse como CDRs Chothia, que tiene límites que se traslapan con CDRs de Kabat. Otros límites que definen CDRs se superponen con las CDRs de Kabat han sido descritos por Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 y MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45). Todavía otras definiciones de límite de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas aquí, pero no obstante se superponen con los CDRs de Kabat, aunque puede ser acortado o alargado en vista de la predicción o resultados experimentales que residuos particulares o grupos de residuos o incluso CDR completa no impacta significativamente la unión de antígeno. Los métodos utilizados en este documento pueden utilizar CDRs que definen de acuerdo con

cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas modalidades utilizan Kabat o Chothia definen CDRs.

El término "marco" o "secuencia de marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDRs. Porque la definición exacta de una secuencia de CDR puede determinarse por diferentes sistemas, el significado de una secuencia de marco es sujeto a interpretaciones diferentes correspondientemente. Las seis CDRs (CDR-L1, -L2 y -L3 de cadena ligera y CDR-H1 - H2 y - H3 de cadena pesada) también dividen las regiones de marco en la cadena ligera y cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) de cada cadena, en donde CDR1 se sitúa entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región de marco, mencionada por otros, representa FR combinados dentro de la región variable de una cadena sencilla de inmunoglobulina de origen natural. FR representa una de las cuatro sub-regiones y FRs representa dos o más de las cuatro sub-regiones que constituyen una región de marco.

El término "gen de anticuerpo de línea germinal" o "fragmento genético" se refiere a una secuencia de inmunoglobulina codificada por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce al reordenamiento genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. (Véase, por ejemplo, Shapiro et al., (2002) Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200; Marchalonis et al (2001) Adv. Exp. Med. Biol. 484:13-30). Una de las ventajas proporcionadas de diversas modalidades deriva del reconocimiento que genes de anticuerpos de línea germinal son más probables que los genes de anticuerpo maduro para conservar las características de estructuras de secuencia de aminoácidos esenciales de los individuos en las especies, por lo tanto menos propensas a ser reconocidas a partir de una fuente extranjera cuando se usa terapéuticamente en esta especie.

El término "neutralización" se refiere a contrarrestar la actividad biológica de un antígeno cuando una proteína de unión se une específicamente al antígeno. En una modalidad, la neutralización de proteína de unión se une a la

citoquina y reduce su actividad biológica por al menos aproximadamente 20%, 40%, 60%, 80%, 85% o más.

El término "actividad" incluye actividades tal como la especificidad de unión y la afinidad de una proteína de unión a DVD para dos o más antígenos.

El término "epítope" incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de célula T. En ciertas modalidades, determinantes de epítope incluyen agrupaciones de superficies químicamente activas de moléculas tal como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de la carga específica. Un epítope es una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Un epítope así consta de los residuos de aminoácidos de una región de un antígeno (o su fragmento) conocido para unir con el sitio complementario en la pareja de unión específica. Un fragmento antigénico puede contener más de un epítope. En ciertas modalidades, un anticuerpo une específicamente a un antígeno cuando reconoce su antígeno objetivo en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. Anticuerpos "unidos con el mismo epítope" si los anticuerpos compiten cruzados (uno evita la unión o efecto de modulación del otro). Además las definiciones estructurales de epítopos (superpuestos, similares, idénticos) son informativas, pero definiciones funcionales son a menudo más relevantes que las que incluyen parámetros estructurales (enlace) y funcionales (modulación, competición).

El término "resonancia de plasmón superficial", como se usa aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespécificas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensores, por ejemplo utilizando el sistema BIAcore® (BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ). Para descricpiones adicionales, véase Jönsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson.

El término "K_{asoc}" se refiere a la constante de velocidad de asociación de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) al antígeno para formar, por

ejemplo, complejo como anticuerpo/antígeno es conocido en la técnica. La "K_{asoc}" también es conocida por los términos "constante de velocidad de asociación", o "ka", como se utiliza intercambiablemente aquí. Este valor indica la velocidad de unión de un anticuerpo a su antígeno objetivo o la velocidad de formación de complejo entre un anticuerpo y antígeno también se muestra por la siguiente ecuación:

Anticuerpo ("Ab") + antígeno ("Ag")$\rightarrow$Ab-Ag.

El término "K_{disoc}" se refiere a la constante de velocidad de disociación, o "constante de velocidad de disociación", de una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) de, por ejemplo, complejo de anticuerpo/antígeno como es conocido en la técnica. La "K_{disoc}" también es conocida por los términos "constante de velocidad de disociación" o "k_d" como se utiliza indistintamente aquí. Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno objetivo o separación del complejo Ab-Ag en el tiempo en anticuerpo libre y antígeno como se muestra en la siguiente ecuación:

AB + Ag$\rightarrow$Ab-Ag

Los términos "K_D" y la "constante de disociación de equilibrio" y se refiere al valor obtenido en una medición de valoración en el equilibrio, o al dividir la constante de velocidad de disociación (k_{disoc}) por la constante de velocidad de asociación (k_{asoc}). La constante de velocidad de asociación, la constante de velocidad de disociación y la constante de disociación de equilibrio, se utilizan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno. Métodos para la determinación de constantes de velocidad de asociación y disociación son conocidos en la técnica. Utilizando técnicas basadas en fluorescencia ofrece alta sensibilidad y la capacidad de examinar muestras en reguladores de pH fisiológicos en el equilibrio. Otros métodos experimentales e instrumentos tal como un ensayo de BIAcore® (análisis de interacción biomolecular), pueden ser utilizados (por ejemplo, instrumento disponible de BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Suecia). Adicionalmente, un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión cinética), disponible de Sapidyne Instruments (Boise, Idaho), también puede ser utilizado.

El término "enlazado operablemente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia de control "enlazada operablemente" a una secuencia de codificación es ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra en condiciones compatibles con las secuencias se control. Secuencias "operablemente enlazadas" incluyen secuencias de control de expresión que son contiguas con el gen de interés y secuencias de control de expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de expresión" como se utiliza aquí se refiere a secuencias de polinucleótido que son útiles para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias de codificación que están ligadas. Secuencias de control de expresión incluyen la iniciación de transcripción apropiada, terminación, secuencias de promotor y potenciador; señales de procesamiento de ARN eficientes tal como señales de poliadenilación y división; secuencias que estabilizan ARNm citoplasmático; secuencias que incrementan la eficiencia de traducción (es decir, la secuencia consenso Kozak); secuencias que incrementan la estabilidad de proteína; y cuando se desee, secuencias que incrementan la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedero; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen promotor, sitio de unión ribosomal, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, por lo general, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias de líder y secuencias de pareja de fusión.

El término "célula hospedera recombinante" (o simplemente "célula hospedera"), está destinado para hacer referencia a una celda en la que se ha introducido ADN exógeno. En una modalidad, la célula hospedera comprende dos más anticuerpos de codificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, múltiples), tal como las células hospederas descritas en Patente de E.U.A. No. 7,262,028, por

ejemplo. Debe entenderse que dichos términos están destinados para referirse no sólo a la célula objetivo particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las sucesivas generaciones debido a la mutación o influencias ambientales, dicha progenie de hecho, no podrá ser idéntica a la célula de origen, pero están todavía incluidas en el alcance del término "célula hospedera" como se usa aquí. En una modalidad, células huésped incluyen células procariotas y eucariotas seleccionadas desde cualquiera de los reinos de la vida. En otra modalidad, células eucariotas incluyen células protistas, fúngicas, de plantas y animales. En otra modalidad, células huésped incluyen pero no están limitadas a la línea de célula procariota E. coli; líneas celulares de mamífero CHO, HEK 293, COS, NS0, SP2 y PER.C6; la línea celular de insectos Sf9; y el célula fúngica Saccharomyces cerevisiae.

Pueden utilizarse técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo de tejido y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Reacciones enzimáticas y técnicas de purificación pueden ser realizadas de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como comúnmente se realiza en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas anteriores y los procedimientos pueden realizarse generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien sabidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas a lo largo de la presente especificación. Véase por ejemplo, Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), que se incorpora aquí para referencia para cualquier propósito.

"Valor predeterminado" y "nivel predeterminado " se refieren generalmente un valor de corte de ensayo que se utiliza para evaluar los resultados de diagnóstico/pronóstico/eficacia terapéutica mediante la comparación de los resultados del ensayo contra el corte/nivel predeterminado, donde el corte/nivel predeterminado ya ha enlazado o asociado con distintos parámetros clínicos (por ejemplo, la gravedad de la enfermedad, progresión/no progresión/mejora, etc.). Aunque la presente descripción puede proporcionar

niveles predeterminados ejemplares, es bien conocido que los valores límite pueden variar dependiendo de la naturaleza del inmunoensayo (por ejemplo, anticuerpos empleados, etc.). Está más bien dentro de la habilidad ordinaria de una persona en la técnica adaptar la descripción aquí para otros inmunoensayos para obtener valores de corte específicos de inmunoensayo para aquellos otros inmunoensayos basados en esta descripción. Considerando que el valor preciso del corte/nivel predeterminado puede variar entre ensayos, correlaciones como se describe aquí (si existe) pueden ser generalmente aplicables.

"Reactivo de pre-tratamiento", por ejemplo, lisis, reactivo de precipitación y/o solubilización, como se utiliza en un ensayo de diagnóstico como se describe aquí es uno que lisa cualquiera de las células y/o solubiliza cualquier analito que esté presente en una muestra de prueba. Pre-tratamiento no es necesario para todas las muestras, como se describe aquí. Entre otras cosas, solubilización del analito (por ejemplo, polipéptido de interés) puede implicar la liberación del analito de cualquiera de las proteínas de unión endógenas presentes en la muestra. Un reactivo de pre-tratamiento puede ser homogéneo (no requieren un paso de separación) o heterogéneo (que requieren un paso de separación). Con el uso de un reactivo de pre-tratamiento heterogéneo existe eliminación de cualquiera de las proteínas de unión del analito precipitado de la muestra de prueba antes de proceder al siguiente paso del ensayo.

"Reactivos de control de calidad" en el contexto de inmunoensayos y kits descritos aquí, incluyen, pero no se limitan a, calibradores, controles y paneles de sensibilidad. Normalmente se utiliza una "calibrador" o "estándar" (por ejemplo, uno o más, tal como una pluralidad) con el fin de establecer las curvas de calibración (estándar) para la interpolación de la concentración de un analito, tal como un anticuerpo o un analito. Alternativamente, puede utilizarse un calibrador sencillo, que está cerca de un determinado corte positivo/negativo. Calibradores múltiples (es decir, más de un calibrador o una cantidad variable de calibradores pueden usarse en conjunción con el fin de comprender un “panel de sensibilidad".

Los términos "específico" y "especificidad" en el contexto de una interacción entre los miembros de un par de unión específica (por ejemplo, un

antígeno (o fragmento del mismo) y un anticuerpo (o su fragmento antigénicamente reactivo)) se refieren a la reactividad selectiva de la interacción. La frase "específicamente une a" y frases análogas se refieren a la capacidad de los anticuerpos (o sus fragmentos antigénicamente reactivos) para unir específicamente al analito (o un fragmento del mismo) y no unir específicamente a otras entidades.

El término "pareja de unión específica" es un miembro de un par de unión específica. Un par de unión específica comprende dos moléculas diferentes, que se unen específicamente entre sí a través de medios químicos o físicos. Por lo tanto, además de los pares de unión específica del antígeno y anticuerpo específico de inmunoensayos comunes, otros pares de unión específica pueden incluir biotina y avidina (o estreptavidina), carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarios, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores de enzima y enzimas, y lo similar. Además, los pares de unión específica pueden incluir miembros que son análogos de los miembros de unión específica originales, por ejemplo, un análogo analito. Los miembros de unión específica inmuno-reactiva incluyen antígenos, fragmentos de antígeno y anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales y policlonales, así como complejos, fragmentos y variantes (que incluyen fragmentos de variantes) del mismo, ya sea aislado o producido de manera recombinante.

El término "variante" significa un polipéptido que difiere de un polipéptido determinado en la secuencia de aminoácidos por la adición (por ejemplo, inserción), eliminación o sustitución conservadora de aminoácidos, pero que retiene la actividad biológica del polipéptido determinado (por ejemplo, una variante IL-17 puede competir con el anticuerpo anti-IL-17 para la unión a IL-17). Una sustitución conservadora de un aminoácido, es decir, reemplazar un aminoácido con un aminoácido diferente de características similares (por ejemplo, hidrofilia y grado y distribución de regiones cargadas) es reconocida en la técnica como normalmente implica un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, al considerar el gran índice hidropático de aminoácidos, como se entiende en la técnica (véase, por ejemplo, Kyte et al (1982) J. Mol. Biol.

157:105-132). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. Es conocido en la técnica que aminoácidos de similares índices hidropáticos pueden sustituirse y conservan la función de las proteínas. En uno aspecto, se sustituyen los aminoácidos que tienen índices hidropáticos de ± 2. La hidrofilicidad de aminoácidos también puede utilizarse para revelar las sustituciones que resultarían en las proteínas que retienen la función biológica. Una consideración de la hidrofilicidad de aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la hidrofilicidad promedio local mayor de este péptido, una medida útil que se ha reportado para correlacionar bien con la antigenicidad e inmunogenicidad (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. No. 4,554,101). Sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilicidad similares puede resultar en péptidos que retienen actividad biológica, por ejemplo inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. En un aspecto, se realizan sustituciones con aminoácidos que tienen valores de hidrofilicidad dentro de ± 2 de cada uno. El índice de hidrofobicidad y el valor de hidrofilicidad de los aminoácidos están influenciados por la cadena lateral particular de este aminoácido. Consistente con esta observación, sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica se entienden que dependen de la relativa similitud de los aminoácidos y particularmente las cadenas laterales de aquellos aminoácidos, como se revela por la hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga, tamaño y otras propiedades. "Variante" también puede utilizarse para describir un polipéptido o su fragmento que ha sido procesado diferencialmente, tal como por proteólisis, fosforilación, y otras modificaciones post-traduccionales, aún conserva su actividad biológica o la reactividad de antígeno, por ejemplo, la capacidad de unir a IL-18. Uso de "variante" aquí pretende incluir fragmentos de una variante a menos que se contradiga por el contexto.

1) Generación de proteína de unión de DVD

Se proporcionan proteínas de unión de dominio variable dual capaces de unir a TNF y métodos para hacer las mismas. La proteína de unión puede generarse utilizando diversas técnicas. Vectores de expresión, célula hospedera y

métodos de generación de la proteína de unión se proporcionan.

A) Construcción de moléculas de proteína de unión de DVD

La molécula de proteína de unión de dominio variable dual (DVD) está diseñada para que dos dominios variables diferentes de cadena ligera (VL) de los dos anticuerpos monoclonales de origen diferentes están unidos en tándem directamente o a través de un enlazador corto por técnicas de ADN recombinante, seguido por el dominio constante de cadena ligera. Asimismo, la cadena pesada consta de dos dominios variables de cadena pesada (VH) enlazados en tándem, seguido por la región CH1 y Fc de dominio constante (Figura 1A).

Los dominios variables pueden obtenerse utilizando técnicas de ADN recombinante de un anticuerpo de origen generado por cualquiera de los métodos descritos en este documento. En una modalidad, el dominio variable es un dominio variable de cadena pesada o cadena ligera de murina. En otra modalidad, el dominio variable es una CDR injertada o un dominio de cadena pesada o ligera variable humanizado. En una modalidad, el dominio variable es un dominio variable de cadena pesada o ligera humano.

En una modalidad el primeros y segundo dominios variables están enlazados directamente entre si usando técnicas de ADN recombinante. En otra modalidad los dominios variables están enlazados a través de una secuencia enlazadora. En una modalidad, dos dominios variables están enlazados. Tres o más dominios variables también pueden unirse directamente o a través de una secuencia enlazadora. Los dominios variables pueden unir el mismo antígeno o pueden unir diferentes antígenos. En algunas modalidades, las moléculas de proteína de unión de DVD pueden incluir un dominio variable de inmunoglobulina y un dominio variable no de inmunoglobulina tal como dominio de unión de ligando de un receptor, dominio activo de una enzima. Las moléculas de proteína de unión de DVD también pueden comprender 2 o más dominios no Ig.

La secuencia enlazadora puede ser un aminoácido sencillo o una secuencia de polipéptido. En una modalidad, las secuencias enlazadoras son: AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO: 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 2);

AKTTPKLGG (SEQ ID NO: 3); SAKTTPKLGG (SEQ ID NO: 4); SAKTTP (SEQ ID NO: 5); RADAAP (SEQ ID NO: 6); RADAAPTVS (SEQ ID NO: 7); RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO: 8); RADAAAA(G4S)4 (SEQ ID NO: 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO: 10); ADAAP (SEQ ID NO: 11); ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO: 12); TVAAP (SEQ ID NO: 13); TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14); QPKAAP (SEQ ID NO: 15); QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16); AKTTPP (SEQ ID NO: 17); AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO: 18); AKTTAP (SEQ ID NO: 19); AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO: 20); ASTKGP (SEQ ID NO: 21); ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 23); GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO: 24); GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO: 25); GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO: 26); TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 27); y ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 28). La elección de secuencias enlazadoras se basa en el análisis de estructura de cristal de varias moléculas Fab. Existe un enlace flexible natural entre el dominio variable y el dominio constante de CH1/CL en Fab o estructura molecular de anticuerpo. Este enlace natural comprende aproximadamente 10-12 residuos de aminoácidos, contribuidos por 4-6 residuos de C-término de dominio V y 4-6 residuos de N-término de dominio CL/CH1. Proteína de unión de DVD Igs se genera usando 5-6 residuos de aminoácidos N-terminales, o residuos de aminoácidos de 11-12, de CL o CH1 como enlazador en cadena ligera y cadena pesada de proteína de unión a DVD, respectivamente. Los residuos N-terminales de dominios CL o CH1, particularmente los primeros 5-6 residuos de aminoácidos, adoptan una conformación de lazo sin fuertes estructuras secundarias, por lo tanto, pueden actuar como enlazadores flexibles entre los dos dominios variables. Los residuos N-terminales de dominios CL o CH1 son una extensión natural de los dominios variables, ya que son parte de las secuencias Ig, por lo tanto minimizan en gran medida cualquier inmunogenicidad potencialmente derivada de los enlazadores y uniones.

Otras secuencias enlazadoras pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud de dominio CL/CH1 pero no todos los residuos del dominio CL/CH1; por ejemplo los primeros 5-12 residuos de aminoácidos de los dominios

CL/CH1; los enlazadores de cadena ligera pueden ser de Cκ o Cλ; y los enlazadores de cadena pesada pueden derivarse de CH1 de cualquiera de los isotipos, incluyendo Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2, Cδ, Cε y Cμ. Secuencias enlazadoras también pueden derivarse de otras proteínas tal como proteínas tipo Ig, (por ejemplo, TCR, FcR, KIR); secuencias basadas en G/S (por ejemplo, repeticiones G4S; SEQ ID NO: 29); secuencias derivadas de la región de articulación; y otras secuencias naturales de otras proteínas.

En una modalidad un dominio constante está enlazado a los dos dominios variables enlazados utilizando técnicas de ADN recombinante. En una modalidad, secuencia que comprende dominios variables de cadena pesada enlazados está enlazada a un dominio constante de cadena pesada y secuencia que comprende dominios variables de cadena ligera enlazados está enlazada a un dominio constante de cadena ligera. En una modalidad, los dominios constantes son dominio constante de cadena pesada humano y dominio constante de cadena ligera humano, respectivamente. En una modalidad, la cadena pesada de DVD está enlazada adicionalmente a una región Fc. La región Fc puede ser región Fc de secuencia nativa, o una región Fc variante. En otra modalidad, la región Fc es una región Fc humana. En otra modalidad la región Fc incluye la región Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE o IgD.

En otra modalidad dos polipéptidos de DVD de cadena pesada y dos polipéptidos de DVD de cadena ligera se combinan para formar una molécula de proteína de unión de DVD. El cuadro 1 enumera las secuencias de aminoácidos de regiones VH y VL de anticuerpos ejemplares para objetivos útiles para tratar la enfermedad, por ejemplo, para tratar el cáncer. En una modalidad, se proporciona una DVD que comprende al menos dos de las regiones VH y/o VL enumeradas en el cuadro 1, en cualquier orientación. En algunas modalidades, VD1 y VD2 se eligen de forma independiente. Por lo tanto, en algunas modalidades, VD1 y VD2 comprenden la misma SEQ ID NO y, en otras modalidades, VD1 y VD2 comprenden diferentes SEQ ID NOS. Las secuencias de dominio VH y VL proporcionadas anteriormente comprenden la región de determinación complementaria (CDR) y secuencias de marco que son conocidas en la técnica o

fácilmente discernibles utilizando métodos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, una o más de estas CDR y/o secuencias de marco se sustituyen, sin pérdida de la función, por otras CDR y/o secuencias de marco de proteínas de unión que son conocidas en la técnica para unir al mismo antígeno.

CUADRO 1

Lista de secuencias de aminoácido de regiones VH y VL de anticuerpos para generación de proteínas de unión a DVD

Se muestran tres variantes diferentes anti-IL-17 en el Cuadro 1A (sec. 1, sec. 2 y sec. 3)

CUADRO 1A

Ciertas regiones VH y VL que unen IL-17

SEQ ID No.	ABT ID único	Región de proteína	Secuencia 12345678901234567890123456789012345678 90
30	AB273VH	VH-IL17 (sec. 1)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEIHW VRQAPGQGLEWMGVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGM DYWGQGTTVTVSS
31	AB273VL	VL-IL17 (sec. 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSGIISYIDWF QQKPGKAPKRLIYATFDLASGVPSRFSGSGSGTDYT LTISSLQPEDFATYYCRQVGSYPETFGQGTKLEIKR
32	AB274VH	VH-IL17 (sec. 2)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGSFGGYGIGW VRQAPGQGLEWMGGITPFFGFADYAQKFQGRVTITA DESTTTAYMELSGLTSDDTAVYYCARDPNEFWNGYY STHDFDSWGQGTTVTVSS
33	AB274VL	VL-IL17 (sec. 2)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQDIGSELHWY QQKPDQPPKLLIKYASHSTSGVPSRFSGSGSGTDFT LTINGLEAEDAGTYYCHQTDSLPYTFGPGTKVDIKR
34	AB275VH	VH-IL17(sec. 3)	EVQLVQSGAEVKKPGESVKISCKASGGSFRSYGISW VRQAPGQGLEWMGGITHFFGITDYAQKFQGRVTITA DESTTTAYMELSGLTSDDTAVYYCAREPNDFWNGYY DTHDFDSWGQGTTVTVSS
35	AB275VL	VL-IL17 (sec. 3)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQNIGSELHWY QQKPDQSPKLLIKYASHSISGVPSRFSGSGSGTDFT LTINGLEAEDAATYYCHQSDTLPHTFGQGTKVDIKR

Los Cuadros 1B y 1C proporcionan las secuencias de VH y VL de anticuerpos monoclonales anti-TNF humano completamente humanos, aislados mediante tecnologías de expresión in vitro a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos, por su capacidad de unirse a proteínas de TNF humano recombinante.

CUADRO 1B

Secuencias de VH anti-TNF-α humano completamente humanas individuales

Región de proteína		SEQ ID NO	Secuencia
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
AE11-1 VH		SEQ ID NO.:36	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYD VN**WVRQATGQGLEWMG**WMNPNSGNTGYAQKFQG**RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAI**F DSDYMDV**WGKGTLVTVSS
AE11-1 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:36	**SYDVN**
AE11-1 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:36	**WMNPNSGNTGYAQKFQG**
AE11-1 VH	**CDR-H3**	Residuos 99-106 de SEQ ID NO.:36	**FDSDYMDV**
AE11-5 VH		SEQ ID NO.:37	EVQLVQSGAEVKKPGSSAKVSCKASGGTFS**SYA IS**WVRQAPGQGLEWMG**GIIPILGTANYAQKFLG**RVTITADESTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR**G LYYDPTRADY**WGQGTLVTVSS
AE11-5 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:37	**SYAIS**
AE11-5 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:37	**GIIPILGTANYAQKFLG**
AE11-5 VH	**CDR-H3**	Residuos 99-109 de SEQ ID NO.:37	**GLYYDPTRADY**
TNF-JK1 VH		SEQ ID NO.:38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFN**NYW MS**WVRQAPGKGLEWVA**NINHDESEKYYVDSAKG**RFTISRDNAEKSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAR**I IRGRVGFDYYNYAMDV**WGQGTLVTVSS
TNF-JK1 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:38	**NYWMS**
TNF-JK1 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:38	**NINHDESEKYYVDSAKG**
TNF-JK1 VH	**CDR-H3**	Residuos 99-115 de SEQ ID NO.:38	**IIRGRVGFDYYNYAMDV**
TNF-JK1 VL	**CDR-L3**	Residuos 89 - 95 de SEQ ID NO.:38	**QESYSLI**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
TNF-Y7C VH		SEQ ID NO.:39	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFS**NYDIN**WVRQPTGQGLEWMG**WMDPNNGNTGY****AQKFVG**RVTMTRDTSKTTAYLELSGLKSED TAVYYCAR**SSGSGGTWYKEYFQS**WGQGTMV TVSS
TNF-Y7C VH	**CDR-H1**	Residues 31-35 de SEQ ID NO.:39	**NYDIN**
TNF-Y7C VH	**CDR-H2**	Residues 50-66 de SEQ ID NO.:39	**WMDPNNGNTGYAQKFVG**
TNF-Y7C VH	**CDR-H3**	Residues 99-112 de SEQ ID NO.:39	**KSSGSGGTWYKEYFQS**
AE11-7 VH		SEQ ID NO.:40	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYSLT**QYPIH**WVRQAPGQRPEWMG**WISPGNGNTKL****SPKFQG**RVTLSRDASAGTVFMDLSGLTSDD TAVYFCTS**VDLGDH**WGQGTLVTVSS
AE11-7 VH	**CDR-H1**	Residues 31-35 de SEQ ID NO.:40	**QYPIH**
AE11-7 VH	**CDR-H2**	Residues 50-66 de SEQ ID NO.:40	**WISPGNGNTKLSPKFQG**
AE11-7 VH	**CDR-H3**	Residues 99-104 de SEQ ID NO.:40	**VDLGDH**
AE11-13 VH		SEQ ID NO.:41	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD**DYPMH**WVRQAPGEGLEWVS**GISSNSASIGY****ADSVKG**RFTISRDNAQNTLYLQMNSLGDED TAVYYCVS**LTLG**IGQGTLVTVSS
AE11-13 VH	**CDR-H1**	Residues 31-35 de SEQ ID NO.:41	**DYPMH**
AE11-13 VH	**CDR-H2**	Residues 50-66 de SEQ ID NO.:41	**GISSNSASIGYADSVKG**
AE11-13 VH	**CDR-H3**	Residues 99-102 de SEQ ID NO.:41	**LTLG**

CUADRO 1C

Secuencias de VL anti-TNF-α humano completamente humanas individuales

Región de proteína		SEQ ID NO	Secuencia
			123456789**0**123456789**0**1234567890
AE11-1 VL		SEQ ID NO.:42	SYELTQPPSVSLSPGQTARITC**SGDALPKQ YAY**WYQQKPGQAPVLVIY**KDTERPS**GIPER FSGSSSGTTVTLTISGAQAEDEADYYCQ**SA DSSGTSWV**FGGGTKLTVL
AE11-1 VL	**CDR-L1**	Residuos 23-33 de SEQ ID NO.:42	**SGDALPKQYAY**
AE11-1 VL	**CDR-L2**	Residuos 49-55 de SEQ ID NO.:42	**KDTERPS**
AE11-1 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-98 de SEQ ID NO.:42	**SADSSGTSWV**
AE11-5 VL		SEQ ID NO.:43	DIVMTQSPDFHSVTPKEKVTITC**RASQSIG SSLH**WYQQKPDQSPKLLIR**HASQSIS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTIHSLEAEDAATYYC**HQ SSSSPPPT**FGQGTQVEIK
AE11-5 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:43	**RASQSIGSSLH**
AE11-5 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:43	**HASQSIS**
AE11-5 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-98 de SEQ ID NO.:43	**HQSSSSPPPT**
TNF-JK1 VL		SEQ ID NO.:44	DIRLTQSPSPLSASVGDRVTITC**RASQSIG NYLN**WYQHKPGKAPKLLIY**AASSLQS**GVPS RFSGTGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QE SYSLI**FAGGTKVEIK
TNF-JK1 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:44	**RASQSIGNYLN**
TNF-JK1 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:44	**AASSLQS**
TNF-JK1 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-95 de SEQ ID NO.:44	**QESYSLI**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
TNF-Y7C VL		SEQ ID NO.:45	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLL HSNGYNYLD**WYLQKPGQFPQLLIY**LGSYRA S**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYC**MQRIEFPPGT**FGQGTKLGIK
TNF-Y7C VL	**CDR-L1**	Residuos 24-39 de SEQ ID NO.:45	**RSSQSLLHSNGYNYLD**
TNF-Y7C VL	**CDR-L2**	Residuos 55-61 de SEQ ID NO.:45	**LGSYRAS**
TNF-Y7C VL	**CDR-L3**	Residuos 94-103 de SEQ ID NO.:45	**MQRIEFPPGT**
AE11-7 VL		SEQ ID NO.:46	DIVMTQSPEFQSVTPKEKVTITC**RASQSIG SSLH**WYQQKPDQSPKLLIN**YASQSFS**GVPS RFSGGGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC**HQ SSNLPIT**FGQGTRLEIK
AE11-7 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:46	**RASQSIGSSLH**
AE11-7 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:46	**YASQSFS**
AE11-7 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:46	**HQSSNLPIT**
AE11-13 VL		SEQ ID NO.:47	DIRLTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSIG NYLH**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLQS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ SYSTLYS**FGQGTKLEIK
AE11-13 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:47	**RASQSIGNYLH**
AE11-13 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:47	**AASSLQS**
AE11-13 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:47	**QQSYSTLYS**

Los cuadros a 1D y 1E continuación proporcionan una lista de anticuerpos MAK-195 anti-TNF humanizados que se convirtieron en proteínas IgG para caracterización, ambas secuencias VH y VL.

CUADRO 1D

Secuencias VH de anticuerpos MAK-195 anti-TNF humanizados de clones convertidos de IgG

Región de proteína			Secuencia
			123456789**0**123456789**0**1234567890
A8 VH		SEQ ID NO.:48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVN**WVRQAPGKGLEWVS**MIAADGFTDYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWHHGPVAY**WGQGTLVTVSS
A8 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:48	**NYGVN**
A8 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:48	**MIAADGFTDYASSVKG**
A8 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:48	**EWHHGPVAY**
B5 VH		SEQ ID NO.:49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVS**WVRQAPGKGLEWVS**LIRGDGSTDYA SSLKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWHHGPVAY**WGQGTLVTVSS
B5 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:49	**NYGVS**
B5 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:49	**LIRGDGSTDYASSLKG**
B5 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:49	**EWHHGPVAY**
rHC44 VH		SEQ ID NO.:50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVS**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA DTLKS**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
rHC44 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:50	**NYGVS**
rHC44 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:50	**MIWADGSTHYADTLKS**
rHC44 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:50	**EWQHGPVAY**

Región de proteína			**Secuencia**
			12345678901234567890123456789**0**
rHC22 VH		SEQ ID NO.:51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTDYA DTVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
rHC22 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:51	**NYGVT**
rHC22 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:51	**MIWADGSTDYADTVKG**
rHC22 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:51	**EWQHGPVAY**
rHC81 VH		SEQ ID NO.:52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA DSVKS**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPLAY**WGQGTLVTVSS
rHC81 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:52	**NYGVT**
rHC81 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:52	**MIWADGSTHYADSVKS**
rHC81 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:52	**EWQHGPLAY**
rHC18 VH		SEQ ID NO.:53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWSDGSTDYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
rHC18 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:53	**NYGVT**
rHC18 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:53	**MIWSDGSTDYASSVKG**
rHC18 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:53	**EWQHGPVAY**

Región de proteína			Secuencia
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
rHC14 VH		SEQ ID NO.:54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSLKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPAAY**WGQGTLVTVSS
rHC14 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:54	**NYGVT**
rHC14 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:54	**MIWADGSTHYASSLKG**
rHC14 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:54	**EWQHGPAAY**
rHC3 VH		SEQ ID NO.:55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVS**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSLKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
rHC3 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:55	**NYGVS**
rHC3 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:55	**MIWADGSTHYASSLKG**
rHC3 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:55	**EWQHGPVAY**
rHC19 VH		SEQ ID NO.:56	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPAAY**WGQGTLVTVSS
rHC19 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:56	**NYGVT**
rHC19 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:56	**MIWADGSTHYASSVKG**
rHC19 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:56	**EWQHGPAAY**

Región de proteína			**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
rHC34 VH		SEQ ID NO.:57	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPSAY**WGQGTLVTVSS
rHC34 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:57	**NYGVT**
rHC34 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:57	**MIWADGSTHYASSVKG**
rHC34 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:57	**EWQHGPSAY**
rHC83 VH		SEQ ID NO.:58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
rHC83 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:58	**NYGVT**
rHC83 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:58	**MIWADGSTHYASSVKG**
rHC83 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:58	**EWQHGPVAY**
S4-19 VH		SEQ ID NO.:59	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVE**WVRQAPGKGLEWVS**GIWADGSTHYA DTVKS**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
S4-19 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:59	**NYGVE**
S4-19 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:59	**GIWADGSTHYADTVKS**
S4-19 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:59	**EWQHGPVAY**

Región de proteína			**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
S4-50 VH		SEQ ID NO.:60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVE**WVRQAPGKGLEWVS**GIWADGSTHYA DTVKS**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVGY**WGQGTLVTVSS
S4-50 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:60	**NYGVE**
S4-50 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:60	**GIWADGSTHYADTVKS**
S4-50 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:60	**EWQHGPVGY**
S4-63 VH		SEQ ID NO.:61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVE**WVRQAPGKGLEWVS**GIWADGSTHYA DTVKS**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVGY**WGQGTLVTVSS
S4-63 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:61	**NYGVE**
S4-63 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:61	**GIWADGSTHYADTVKS**
S4-63 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:61	**EWQHGPVGY**
S4-55 VH		SEQ ID NO.:62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTDYA STVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVGY**WGQGTLVTVSS
S4-55 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:62	**NYGVT**
S4-55 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:62	**MIWADGSTDYASTVKG**
S4-55 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:62	**EWQHGPVGY**

Región de proteína			**Secuencia**
			12345678901234567890123456789**0**
S4-6 VH		SEQ ID NO.:63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
S4-6 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:63	**NYGVT**
S4-6 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:63	**MIWADGSTHYASSVKG**
S4-6 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:63	**EWQHGPVAY**
S4-18 VH		SEQ ID NO.:64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA DSVKS**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPLAY**WGQGTLVTVSS
S4-18 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:64	**NYGVT**
S4-18 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:64	**MIWADGSTHYADSVKS**
S4-18 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:64	**EWQHGPLAY**
S4-31 VH		SEQ ID NO.:65	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVQ**WVRQAPGKGLEWVS**GIGADGSTAYA SSLKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHSGLAY**WGQGTLVTVSS
S4-31 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:65	**NYGVQ**
S4-31 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:65	**GIGADGSTAYASSLKG**
S4-31 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:65	**EWQHSGLAY**

Región de proteína			**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
S4-34 VH		SEQ ID NO.:66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVS**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA DTVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPLAY**WGQGTLVTVSS
S4-34 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:66	**NYGVS**
S4-34 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:66	**MIWADGSTHYADTVKG**
S4-34 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:66	**EWQHGPLAY**
S4-74 VH		SEQ ID NO.:67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA DTVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPLAY**WGQGTLVTVSS
S4-74 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:67	**NYGVT**
S4-74 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:67	**MIWADGSTHYADTVKG**
S4-74 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:67	**EWQHGPLAY**
S4-12 VH		SEQ ID NO.:68	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
S4-12 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:68	**NYGVT**
S4-12 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:68	**MIWADGSTHYASSVKG**
S4-12 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:68	**EWQHGPVAY**

Región de proteína			**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
S4-54 VH		SEQ ID NO.:69	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
S4-54 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:69	**NYGVT**
S4-54 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:69	**MIWADGSTHYASSVKG**
S4-54 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:69	**EWQHGPVAY**
S4-17 VH		SEQ ID NO.:70	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
S4-17 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:70	**NYGVT**
S4-17 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:70	**MIWADGSTHYASSVKG**
S4-17 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:70	**EWQHGPVAY**
S4-40 VH		SEQ ID NO.:71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
S4-40 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:71	**NYGVT**
S4-40 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:71	**MIWADGSTHYASSVKG**
S4-40 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:71	**EWQHGPVAY**

Región de proteína			Secuencia
			123456789**0**123456789**0**1234567890
S4-24 VH		SEQ ID NO.:72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYGVT**WVRQAPGKGLEWVS**MIWADGSTHYA SSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAR**EWQHGPVAY**WGQGTLVTVSS
S4-24 VH	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:72	**NYGVT**
S4-24 VH	**CDR-H2**	Residuos 50-65 de SEQ ID NO.:72	**MIWADGSTHYASSVKG**
S4-24 VH	**CDR-H3**	Residuos 98-106 de SEQ ID NO.:72	**EWQHGPVAY**

CUADRO 1E

Secuencias VL de anticuerpos MAK-195 anti-TNF humanizados de clones convertidos de IgG

Región de proteína		SEQ ID NO.	Secuencia
			123456789**0**123456789**0**1234567890
hMAK195 VL.1 VL		SEQ ID NO.:73	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQAVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTRHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYSTPFT**FGQGTKLEIKR
hMAK195 VL.1 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:73	**KASQAVSSAVA**
hMAK195 VL.1 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:73	**WASTRHT**
hMAK195 VL.1 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:73	**QQHYSTPFT**

Región de proteína		SEQ ID NO.	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
S4-24 VL		SEQ ID NO.:74	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVSSAV A**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTLHT**GVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQHYRTPFT**FG QGTKLEIKR
S4-24 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:74	**RASQLVSSAVA**
S4-24 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:74	**WASTLHT**
S4-24 VL	**CDR-L3**	Residuos 89 - 97 de SEQ ID NO.:74	**QQHYRTPFT**
S4-40 VL		SEQ ID NO.:75	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVSSAV A**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTRHS**GVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQHYRTPFS**FG QGTKLEIKR
S4-40 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:75	**RASQLVSSAVA**
S4-40 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:75	**WASTRHS**
S4-40 VL	**CDR-L3**	Residuos 89 - 97 de SEQ ID NO.:75	**QQHYRTPFS**
S4-17 VL		SEQ ID NO.:76	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVSSAV A**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTRHS**GVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQHYRTPFT**FG QGTKLEIKR
S4-17 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:76	**RASQLVSSAVA**
S4-17 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:76	**WASTRHS**
S4-17 VL	**CDR-L3**	Residuos 89 - 97 de SEQ ID NO.:76	**QQHYRTPFT**

	Región de proteína		SEQ ID NO.	Secuencia
				123456789**0**123456789**0**1234567890
SEQ ID No. 77 78 79	**S4-54 VL**		SEQ ID NO.:77	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASARHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYKTPFS**FGQGTKLEIKR
	S4-54 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:77	**RASQLVSSAVA**
	S4-54 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:77	**WASARHT**
	S4-54 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:77	**QQHYKTPFS**
	S4-12 VL		SEQ ID NO.:78	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASARHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYKTPFT**FGQGTKLEIKR
	S4-12 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:78	**RASQLVSSAVA**
	S4-12 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:78	**WASARHT**
	S4-12 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:78	**QQHYKTPFT**
	S4-74 VL		SEQ ID NO.:79	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASARHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYRTPFT**FGQGTKLEIKR
	S4-74 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:79	**RASQLVSSAVA**
	S4-74 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:79	**WASARHT**
	S4-74 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:79	**QQHYRTPFT**

Región de proteína		SEQ ID NO.	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
S4-34 VL		SEQ ID NO.:80	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTRHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYRTPFT**FGQGTKLEIKR
S4-34 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:80	**RASQLVSSAVA**
S4-34 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:80	**WASTRHT**
S4-34 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:80	**QQHYRTPFT**
S4-31 VL		SEQ ID NO.:81	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGVS SALA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASALHS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYSAPFT**FGQGTKLEIKR
S4-31 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:81	**RASQGVSSALA**
S4-31 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:81	**WASALHS**
S4-31 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:81	**QQHYSAPFT**
S4-18 VL		SEQ ID NO.:82	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTLHS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYSTPFT**FGQGTKLEIKR
S4-18 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:82	**RASQLVSSAVA**
S4-18 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:82	**WASTLHS**
S4-18 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:82	**QQHYSTPFT**

Región de proteína			**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
S4-6 VL		SEQ ID NO.:83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTRHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYSTPFT**FGQGTKLEIKR
S4-6 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:83	**KASQLVSSAVA**
S4-6 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:83	**WASTRHT**
S4-6 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:83	**QQHYSTPFT**
S4-55 VL		SEQ ID NO.:84	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTLHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYRTPFT**FGQGTKLEIKR
S4-55 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:84	**KASQLVSSAVA**
S4-55 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:84	**WASTLHT**
S4-55 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:84	**QQHYRTPFT**
S4-63 VL		SEQ ID NO.:85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQKVS SALA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASALHS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYRPPFT**FGQGTKLEIKR
S4-63 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:85	**KASQKVSSALA**
S4-63 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:85	**WASALHS**
S4-63 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:85	**QQHYRPPFT**

Región de proteína		SEQ ID NO.	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
S4-50 VL		SEQ ID NO.:86	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASALHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYSSPYT**FGQGTKLEIKR
S4-50 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:86	**KASQLVSSAVA**
S4-50 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:86	**WASALHT**
S4-50 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:86	**QQHYSSPYT**
S4-19 VL		SEQ ID NO.:87	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQLVS SAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTLHT**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ HYRTPFT**FGQGTKLEIKR
S4-19 VL	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:87	**KASQLVSSAVA**
S4-19 VL	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:87	**WASTLHT**
S4-19 VL	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:87	**QQHYRTPFT**

Los cuadros a continuación proporcionan una lista de anticuerpos MAK-199 humanizados que son convertidos en proteínas IgG para caracterización, ambas secuencias VH y VL.

CUADRO 1F

Secuencias VH de anticuerpos MAK-199 anti-TNF humanizados de clones convertidos de IgG

Región de proteína		SEQ ID NO	Secuencia
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
J662M2S3#10 **VH**		SEQ ID NO.:88	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFA **NYGII**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGKPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**KLFTTMDVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#10 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:88	**NYGII**
J662M2S3#10 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:88	**WINTYTGKPTYAQKFQG**
J662M2S3#10 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:88	**RASQDISQYLN**
J662M2S3#13 **VH**		SEQ ID NO.:89	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFN **NYGII**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGKPTY AQKLQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR**KLFNTVDVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#13 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:89	**NYGII**
J662M2S3#13 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:89	**WINTYTGKPTYAQKLQG**
J662M2S3#13 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:89	**KLFNTVDVTDNAMD**
J662M2S3#15 **VH**		SEQ ID NO.:90	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFN **NYGII**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGVPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**KLFNTVDVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#15 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:90	**NYGII**
J662M2S3#15 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:90	**WINTYTGVPTYAQKFQG**
J662M2S3#15 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:90	**KLFNTVDVTDNAMD**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
J662M2S3#16 **VH**		SEQ ID NO.:91	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFN **NYGII**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGKPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**KLFNTVAVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#16 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:91	**NYGII**
J662M2S3#16 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:91	**WINTYTGKPTYAQKFQG**
J662M2S3#16 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:91	**KLFNTVAVTDNAMD**
J662M2S3#21 **VH**		SEQ ID NO.:92	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFR **NYGII**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGKPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR**KLFTTVDVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#21 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:92	**NYGII**
J662M2S3#21 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:92	**WINTYTGKPTYAQKFQG**
J662M2S3#21 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:92	**KLFTTVDVTDNAMD**
J662M2S3#34 **VH**		SEQ ID NO.:93	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFN **NYGIN**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGKPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR**KFRNTVAVTDYAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#34 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:93	**NYGIN**
J662M2S3#34 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:93	**WINTYTGKPTYAQKFQG**
J662M2S3#34 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:93	**KFRNTVAVTDYAMD**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
J662M2S3#36 **VH**		SEQ ID NO.:94	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFR **NYGIT**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGKPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR**KLFTTMDVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#36 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:94	**NYGIT**
J662M2S3#36 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:94	**WINTYTGKPTYAQKFQG**
J662M2S3#36 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:94	**KLFTTMDVTDNAMD**
J662M2S3#45 **VH**		SEQ ID NO.:95	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFA **NYGII**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGKPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**KLFTTMDVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#45 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:95	**NYGII**
J662M2S3#45 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:95	**WINTYTGKPTYAQKFQG**
J662M2S3#45 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:95	**KLFTTMDVTDNAMD**
J662M2S3#58 **VH**		SEQ ID NO.:96	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFS **NYGIN**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGQPSY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR**KLFKTEAVTDYAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#58 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:96	**NYGIN**
J662M2S3#58 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:96	**WINTYTGQPSYAQKFQG**
J662M2S3#58 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:96	**KLFKTEAVTDYAMD**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			1234567890123456789**0**1234567890
J662M2S3#72 **VH**		SEQ ID NO.:97	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFN **NYGII**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYSGKPTY AQKFQG**RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYFCAR**KLFTTMDVTDNAMD**YWGQGTTV TVSS
J662M2S3#72 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:97	**NYGII**
J662M2S3#72 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:97	**WINTYSGKPTYAQKFQG**
J662M2S3#72 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-112 de SEQ ID NO.:97	**KLFTTMDVTDNAMD**

CUADRO 1G

Secuencias VL de anticuerpos MAK-199 anti-TNF humanizados de clones convertidos de IgG

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			1234567890123456789**0**1234567890
J662M2S3#10 **VL**		SEQ ID NO.:98	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIS QYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQ GNTWPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#10 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:98	**RASQDISQYLN**
J662M2S3#10 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:98	**YTSRLQS**
J662M2S3#10 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:98	**QQGNTWPPT**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
J662M2S3#13 **VL**		SEQ ID NO.:99	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC**QQGNSWPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#13 **VL**	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:99	**RASQDISNYLN**
J662M2S3#13 **VL**	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:99	**YTSRLQS**
J662M2S3#13 **VL**	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:99	**QQGNSWPPT**
J662M2S3#15 **VL**		SEQ ID NO.:100	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIYNYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC**QQGNTQPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#15 **VL**	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:100	**RASQDIYNYLN**
J662M2S3#15 **VL**	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:100	**YTSRLQS**
J662M2S3#15 **VL**	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:100	**QQGNTQPPT**
J662M2S3#16 **VL**		SEQ ID NO.:101	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIENYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQGNTQPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#16 **VL**	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:101	**RASQDIENYLN**
J662M2S3#16 **VL**	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:101	**YTSRLQS**
J662M2S3#16 **VL**	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:101	**QQGNTQPPT**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
J662M2S3#21 **VL**		SEQ ID NO.:102	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIS NYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC**QQ GNTWPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#21 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:102	**RASQDISNYLN**
J662M2S3#21 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:102	**YTSRLQS**
J662M2S3#21 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:102	**QQGNTWPPT**
J662M2S3#34 **VL**		SEQ ID NO.:103	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIY DVLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YASRLQS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ GITLPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#34 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:103	**RASQDIYDVLN**
J662M2S3#34 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:103	**YASRLQS**
J662M2S3#34 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:103	**QQGITLPPT**
J662M2S3#36 **VL**		SEQ ID NO.:104	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIS NYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC**QQ GNTWPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#36 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:104	**RASQDISNYLN**
J662M2S3#36 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:104	**YTSRLQS**
J662M2S3#36 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:104	**QQGNTWPPT**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
J662M2S3#45 **VL**		SEQ ID NO.:105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIS QYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQ GNTWPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#45 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:105	**RASQDISQYLN**
J662M2S3#45 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:105	**YTSRLQS**
J662M2S3#45 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:105	**QQGNTWPPT**
J662M2S3#58 **VL**		SEQ ID NO.:106	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQNIY NVLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YASRLQS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFC**QQ GNTMPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#58 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:106	**RASQNIYNVLN**
J662M2S3#58 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:106	**YASRLQS**
J662M2S3#58 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:106	**QQGNTMPPT**
J662M2S3#72 **VL**		SEQ ID NO.:107	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDIS NFLN**WYQQKPGKAPKLLIY**YTSRLQS**GVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC**QQ GNTQPPT**FGQGTKLEIK
J662M2S3#72 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:107	**RASQDISNFLN**
J662M2S3#72 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:107	**YTSRLQS**
J662M2S3#72 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:107	**QQGNTQPPT**

Los siguientes cuadros proporcionan secuencias de anti-IL-17 de clones convertidos.

CUADRO 1H

Secuencias VH de anticuerpos anti-IL-17 individuales de clones convertidos para generar proteínas de unión de DVD

Región de proteína			Secuencia
			123456789**0**123456789**0**1234567890
h10f7VH.1a.g1m **VH**		SEQ ID NO.:108	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT **DYEIHW**VRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFY NQKFDG**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**WGQGTTVTVS S
h10f7VH.1a.g1m **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:108	**DYEIH**
h10f7VH.1a.g1m **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:108	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
h10f7VH.1a.g1m **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:108	**YYRYESFYGMDY**
			12345678901234567890123456789 0
J439M1S3R5#10 **VH**		SEQ ID NO.:109	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD **DYEIH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFY NQKFDG**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**WGQGTTVTVS S
J439M1S3R5#10 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:109	**DYEIH**
J439M1S3R5#10 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:109	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S3R5#10 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:109	**YDKWDSFYGMDY**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
J439M1S3R5 #11 **VH**		SEQ ID NO.:110	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT **DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFY NQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**WGQGTTVTVS S
J439M1S3R5 #11 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:110	**DYEIH**
J439M1S3R5 #11 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:110	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S3R5 #11 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:110	**YSKWDSFDGMDY**
J439M1S2(H)3 #A6 **VH**		SEQ ID NO.:111	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT **DYEIH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLY NQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**WGQGTTVTVS S
439M1S2(H) 3 #A6 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:111	**DYEIH**
439M1S2(H) 3 #A6 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:111	**VNDPDSGGTLYNQKFDG**
439M1S2(H) 3 #A6 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:111	**YDKWYSFEGMDI**
J439M1S2(H) 3 #A11 **VH**		SEQ ID NO.:112	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT **DYEIH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFY NQKFDG**RVTLSADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**WGQGTTVTVS S
J439M1S2(H) 3 #A11 **VH**	**CDR -H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:112	**DYEIH**
J439M1S2(H) 3 #A11 **VH**	**CDR -H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:112	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H) 3 #A11 **VH**	**CDR -H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:112	**YDKYWSFEGMDY**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
J439M1S2(H)3 #A16 **VH**		SEQ ID NO.:113	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**WGQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3 #A16 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:113	**DYEIH**
J439M1S2(H)3 #A16 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:113	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H)3 #A16 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:113	**DKWYSFEGMDI**
J439M1S2(H)3 #B13 **VH**		SEQ ID NO.:114	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**WGQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3 #B13 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:114	**DYEIH**
J439M1S2(H)3 #B13 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:114	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H)3 #B13 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:114	**DKYWSFEGMDY**
J439M1S2(H)3 #B20 **VH**		SEQ ID NO.:115	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**WGQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3 #B20 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:115	**DYEIH**
J439M1S2(H)3 #B20 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:115	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H)3 #B20 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:115	**DKWYSFEGMDI**

CUADRO 1I

Secuencias VL de anticuerpos anti-IL-17 de clones convertidos para generar proteínas de unión de DVD

Región de proteína		SEQ ID NO.	Secuencia
			123456789**0**123456789**0**1234567890
J439M1S3R5 #10 **VL**		SEQ ID NO.:116	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSI SYID**WFQQKPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**HQ LGSYPDT**FGQGTKLEIK
J439M1S3R5 #10 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:116	**SASSGSISYID**
J439M1S3R5 #10 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:116	**ATFELAS**
J439M1S3R5 #10 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:116	**HQLGSYPDT**
J439M1S3R5 #11 **VL**		SEQ ID NO.:117	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGII SYID**WFQQKPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC**RQ VGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S3R5 #11 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:117	**RASSGIISYID**
J439M1S3R5 #11 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:117	**ATFDLAS**
J439M1S3R5 #11 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:117	**RQVGSYPET**
J427 M2S3 #12 **VL**		SEQ ID NO.:118	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGII SSID**WFQQKPGKAPKRLIY**ATFALQS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**SQ MSSYPHT**FGQGTKLEIK
J427 M2S3 #12 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:118	**SASSGIISSID**
J427 M2S3 #12 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:118	**ATFALQS**
J427 M2S3 #12 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:118	**SQMSSYPHT**

Región de proteína		SEQ ID NO.	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
J427 M2S3 #27 **VL**		SEQ ID NO.:119	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDIS SYLN**WFQQKPGKSPKRLIY**RTSELQS**GVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ WSSYPWT**FGQGTKLEIK
J427 M2S3 #27 **VL**	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:119	**SASSDISSYLN**
J427 M2S3 #27 **VL**	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:119	**RTSELQS**
J427 M2S3 #27 **VL**	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:119	**QQWSSYPWT**
J439M1S2(H)3#A6 **VL**		SEQ ID NO.:120	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIR SYID**WFQQKPGKSPKRLIY**ATFDLAS**GVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC**RQ VGNYPGT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3#A6 **VL**	**CDR-L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:120	**SASQGIRSYID**
J439M1S2(H)3#A6 **VL**	**CDR-L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:120	**ATFDLAS**
J439M1S2(H)3#A6 **VL**	**CDR-L3**	Residuos 89-97 de SEQ ID NO.:120	**RQVGNYPGT**

Descripción detallada de moléculas de proteína de unión de DVD específicas capaces de enlazar objetivos específicos, y métodos para hacer las mismas, se proporcionan en la sección de ejemplos posteriores.

B) producción de proteínas de unión de DVD

Las proteínas de unión establecidas aquí pueden ser producidas por cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión de las células huésped, donde el o los vectores de expresión de codificación de las cadenas ligeras de DVD y pesadas de DVD se transfectaron en una célula huésped por técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedera procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar las proteínas de unión de DVD proporcionadas aquí en cualquiera de las células huésped procariotas o eucariotas, proteínas DVD están expresadas en las células eucariotas, por ejemplo, las células huésped de mamífero, ya que esas células eucariotas (y en particular células de mamífero) es más probables a diferencia de las células procariotas que monten y secreten una proteína DVD correctamente plegada e inmunológicamente activa.

Las células huésped de mamífero ejemplares para expresar los anticuerpos recombinantes proporcionados aquí incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizado con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS, SP2 y células PER.C6. Cuando vectores de expresión recombinante de codificación de proteínas de DVD se introducen en las células huésped de mamífero, las proteínas DVD son producidas por el cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de las proteínas DVD en las células huésped o secreción de las proteínas DVD en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Proteínas DVD se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas estándar.

En un sistema ejemplar de expresión recombinante de proteínas DVD provistas aquí, un vector de expresión recombinante de codificación de la cadena

pesada de DVD y la cadena ligera de DVD se introduce en las células de dhfr-CHO por transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena ligera y pesada de DVD están cada uno operativamente enlazado con potenciador CMV/elementos reguladores promotores AdMLP para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector mediante selección/amplificación de metotrexato. Se cultivan las células huésped transformantes seleccionadas para permitir la expresión de las cadenas ligera y pesada de DVD y la proteína DVD intacta es recuperada desde el medio de cultivo. Técnicas estándar de biología molecular se utilizan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar la proteína DVD del medio de cultivo. También se proporciona un método de síntesis de una proteína DVD provista aquí por el cultivo de una célula huésped proporcionada aquí en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetice una proteína DVD. El método puede comprender además aislar la proteína DVD del medio de cultivo.

Una característica importante de proteína de unión de DVD es que puede ser producida y purificada de manera similar como un anticuerpo convencional. La producción de proteína de unión de DVD resulta en un producto importante homogéneo, sencillo con actividad específica dual deseada, sin ninguna modificación de secuencia de la región constante o modificaciones químicas de ningún tipo. Otros métodos anteriormente descritos para generar proteínas de unión de longitud completa "bi-específica", "multi-específica" y "multivalente multi-específica" no conducen a un solo producto primario pero en cambio conducen a la producción intracelular o secretada de una mezcla de proteínas de unión de longitud completa inactivas ensambladas, mono-específicas, multi-específicas, multivalentes, y proteínas de unión de longitud completa multivalentes con combinación de sitios de enlace diferentes. Como un ejemplo, basado en el diseño descrito por Miller y Presta (Publicación PCT No. WO2001/077342), hay 16 combinaciones posibles de las cadenas ligeras y pesadas. En consecuencia sólo el

6.25% de proteína es muy probable que esté en la forma activa deseada y no como un solo producto primario o único producto primario en comparación con las otras 15 combinaciones posibles. Separación de las formas completamente activas, deseadas de la proteína de formas inactivas y parcialmente activas de la proteína mediante técnicas de cromatografía estándar, normalmente utilizadas en la fabricación de gran escala, todavía está por demostrarse.

Sorprendentemente el diseño de las "proteínas de unión de longitud completa multivalentes dual específica" provisto aquí conduce a una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable doble que monta principalmente a las "proteínas de unión de longitud completa multivalente dual específica".

Al menos 50%, al menos 75% y al menos 90% de las moléculas de inmunoglobulina de dominio variable duales montadas y expresadas son la proteína deseada tetravalente dual específica. Esta modalidad particularmente mejora la utilidad comercial. Por lo tanto, se proporciona un método para expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una sola célula que conduce a un solo producto primario de una "proteína de unión de longitud completa tetravalente dual específica".

Métodos de expresar una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual en una sola célula que conduce a un "producto primario" de una " proteína de unión de longitud completa tetravalente dual específica", donde el "producto primario" es más del 50%, tal como más del 75% y más del 90%, de toda la proteína ensamblada, que comprende una cadena ligera de dominio variable dual y una cadena pesada de dominio variable dual se proporcionan.

II) Proteínas de unión de DVD derivadas

Una modalidad proporciona una proteína de unión etiquetada en donde la proteína de unión es derivada o enlazada a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, una proteína de unión etiquetada se puede derivar por medio de enlace funcionalmente a una proteína de unión

proporcionada aquí (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otra) a una o más entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo bi-específico o un di-acuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación de la proteína de unión con otra molécula (como una región de núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina). Enfoques a proteínas de derivación son ejemplificados en la técnica y en la habilidad de la persona de experiencia en la técnica.

III) usos de proteínas de unión de DVD

Dada su capacidad para enlazar a dos o más antígenos las proteínas de unión proporcionadas aquí pueden utilizarse para detectar los antígenos (por ejemplo, en una muestra biológica, como suero o plasma), utilizando un inmunoensayo convencional, tales como ensayos inmunosorbentes enlazado a enzima (ELISA), un radio-inmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La proteína de unión de DVD está etiquetada directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Sustancias detectables convenientes incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas convenientes incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos del grupo prostético conveniente incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos de material radiactivo apto incluyen , ^{14}C, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{177}Lu, ^{166}Ho, or ^{153}Sm.

En una modalidad, las proteínas de unión proporcionadas son capaces de neutralizar la actividad de los antígenos tanto in vitro como in vivo. En consecuencia, estas proteínas de unión de DVD pueden utilizarse para inhibir la actividad de antígeno, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene los

antígenos, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen los antígenos con los cuales una proteína de unión proporcionada aquí reacciona de manera cruzada. En otra modalidad, se proporciona un método para reducir la actividad de antígeno en un sujeto que padece de una enfermedad o trastorno en donde la actividad de antígeno es perjudicial. Una proteína de unión proporcionada aquí puede ser administrada a un sujeto humano con fines terapéuticos.

El término "un trastorno en el que la actividad de antígeno es perjudicial" pretende incluir las enfermedades y otros trastornos en los que la presencia del antígeno en un sujeto que padece el trastorno ha demostrado ser o se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye al empeoramiento del trastorno. En consecuencia, un trastorno en donde la actividad de antígeno es perjudicial es un trastorno en donde la reducción de la actividad de antígeno se espera que alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos pueden probarse, por ejemplo, por un aumento en la concentración del antígeno en un fluido biológico de un sujeto que padece del trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de antígeno en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto). Ejemplos no limitantes de los trastornos que pueden tratarse con las proteínas de unión proporcionadas aquí incluyen aquellos trastornos que se discuten a continuación y en la sección relativa a las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de unión.

Las proteínas de unión de DVD son útiles como agentes terapéuticos para bloquear simultáneamente dos objetivos diferentes para mejorar la eficacia/seguridad y/o aumentar la cobertura del paciente. Dichos objetivos pueden incluir objetivos solubles (TNF) y objetivos de receptor de superficie celular (VEGFR y EGFR). También puede utilizarse para inducir citotoxicidad re-direccionada entre células tumorales y células T (Her2 y CD3) para la terapia del cáncer, o entre células auto-reactivas y células efectoras para la enfermedad autoinmune o trasplante o entre cualquier célula objetivo y célula efectora para eliminar las células causantes de enfermedades en cualquier enfermedad dada.

Además, puede utilizarse la proteína de unión de DVD para disparar el agrupamiento del receptor y activación cuando está diseñado para dirigir dos

epítopes diferentes en el mismo receptor. Esto puede tener beneficios en la fabricación de terapias anti-GPCR agonísticas y antagonísticas. En este caso, la proteína de unión de DVD puede utilizarse para dirigir dos epítopes diferentes (incluidos los epítopes en las regiones de bucle y el dominio extracelular) en una célula para el agrupamiento/señalización (dos moléculas de superficie celular) o señalización (en una molécula). Asimismo, una molécula de proteína de unión de DVD puede diseñarse para disparar la ligación de CTLA-4 y una señal negativa al dirigir dos diferentes epítopes (o 2 copias del mismo epítope) del dominio extracelular de CTLA-4, llevando a la sub-regulación de la respuesta inmune. CTLA-4 es un objetivo clínicamente validado para el tratamiento terapéutico de una serie de trastornos inmunológicos. Interacciones de CTLA-4/B7 regulan negativamente la activación de células T atenuando la progresión del ciclo celular, producción de IL-2 y la proliferación de células T tras la activación, y acoplamiento de CTLA-4 (CD152) puede sub-regular la activación de células T y promover la inducción de tolerancia inmunológica. Sin embargo, la estrategia de atenuar la activación de células T por acoplamiento de anticuerpo agonístico de CTLA-4 no ha tenido éxito ya que la activación de CTLA-4 requiere ligación. La interacción molecular de CTLA-4/B7 es en arreglos " cremallera sesgada", como lo demuestra el análisis estructural de cristal (Stamper 2001 Nature 410:608). Sin embargo, ninguno de los reactivos de enlace de CTLA-4 disponibles en la actualidad tienen propiedades de ligación, incluyendo mAbs anti-CTLA-4. Ha habido varios intentos para abordar esta cuestión. En un caso, un anticuerpo de cadena simple enlazado a miembros celulares se generó y significativamente inhibió el rechazo alogénico en ratones (Hwang 2002 JI 169:633). En un caso separado, anticuerpo de cadena sencilla enlazado a la superficie APC artificial a CTLA-4 fue generado y demostrado para atenuar las respuestas de células T (Griffin 2000 JI 164:4433). En ambos casos, la ligación de CTLA-4 se logró por anticuerpos de unión a miembros estrechamente localizados en sistemas artificiales. Mientras que estos experimentos proporcionan prueba de concepto para la sub-regulación inmune accionando la señalización negativa CTLA-4, los reactivos utilizados en estos informes no son adecuados para uso terapéutico. Con este fin, la ligación de

CTLA-4 puede lograrse mediante el uso de una molécula de proteína de unión de DVD, que dirigen dos epítopes diferentes (o 2 copias del mismo epítope) del dominio extracelular de CTLA-4. La razón es que la distancia que abarca dos sitios de unión de una IgG, aproximadamente 150-170Å, es demasiado grande para la ligación activa de CTLA-4 (30-50 Å entre 2 homodímeros de CTLA-4). Sin embargo, la distancia entre los sitios de unión de dos en la proteína de unión de DVD- (un brazo) es mucho más corta, también en el rango de 30-50 Å, permitiendo la correcta ligación de CTLA-4.

Asimismo, proteína de unión de DVD puede dirigir dos miembros diferentes de un complejo de receptor de superficie celular (por ejemplo, IL-12R alfa y beta). Además, proteína de unión de DVD puede dirigir CR1 y una proteína soluble/patógeno para accionar la evacuación rápida de la proteína soluble objetivo/patógeno.

Además, proteínas de proteína de DVD proporcionadas aquí pueden ser empleadas para la entrega específica de tejidos (dirigir un marcador de tejido y un mediador de enfermedad para PK local mejorada así una mayor eficacia y/o menor toxicidad), incluyendo la entrega intracelular (direccionando un receptor de internalización y una molécula intracelular), entregando al interior del cerebro (dirigiendo el receptor de transferrina y un mediador de enfermedad de CNS para cruzar la barrera sangre-cerebro). La proteína de unión de DVD puede servir también como proteína portadora para entregar un antígeno a un lugar específico a través del enlace a un epítope no neutralizante de ese antígeno y también para aumentar la vida media del antígeno. Además, la proteína de unión de DVD puede diseñarse para enlazarse físicamente a dispositivos médicos implantados en pacientes o dirigir estos dispositivos médicos (véase Burke et al (2006) Advanced Drug Deliv. Rev. 58(3): 437-446; Hildebrand et al. (2006) Surface and Coatings Technol. 200(22-23): 6318-6324; Drug/ device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu (2006) Biomaterials 27(11):2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices, Marques (2005) Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med. 377-397). Brevemente, el direccionamiento de tipos apropiados de células al sitio de

implante médico puede promover la curación y restauración de la función normal del tejido. Alternativamente, la inhibición de mediadores (incluyendo pero no limitado a las citoquinas), liberada a la implantación del dispositivo por un DVD acoplado a o dirigido a un dispositivo también se proporciona. Por ejemplo, Stents se han usado por años en cardiología intervencionista para despejar las arterias bloqueadas y mejorar el flujo de sangre al músculo cardíaco. Sin embargo, los stents de metales desnudos tradicionales se han conocido por causar restenosis (re-estrechamiento de la arteria en un área tratada) en algunos pacientes y puede llevar a coágulos de sangre. Recientemente, se ha descrito un stent recubierto con anticuerpos anti-CD34 que reduce la restenosis y evita que coágulos de sangre ocurran al capturar las células endoteliales progenitoras (CEP) circulando por toda la sangre. Las células endoteliales son células que recubren los vasos sanguíneos, permitiendo que la sangre fluya uniformemente. Las EPC se adhieren a la superficie dura del stent formando una capa lisa que no sólo promueve la cura sino que previene la restenosis y coágulos de sangre, las complicaciones previamente asociadas con el uso de stents (Aoji et al (2005) J. Am. Coll Cardiol. 45(10):1574-9). Además de mejorar los resultados en pacientes que requieren stents, también hay repercusiones en pacientes que requieran cirugía de derivación cardiovascular. Por ejemplo, un conducto vascular protésico (arteria artificial) recubierto con anticuerpos anti-EPC que eliminarían la necesidad de utilizar las arterias de las piernas de los pacientes o los brazos para injertos de cirugía de derivación. Esto reduciría tiempos de cirugía y anestesia, que a su vez reducirá las muertes por cirugía coronaria. Proteína de unión de DVD están diseñados de tal manera que se une a un marcador de superficie celular (como CD34) así como una proteína (o un epítope de cualquier tipo, incluyendo pero no limitado a las proteínas, lípidos y polisacáridos) que se ha recubierto en el dispositivo implantado para facilitar la contratación de células. Estos enfoques pueden también aplicarse a otros implantes médicos en general. Alternativamente, proteínas de unión de DVD pueden estar revestidas en dispositivos médicos y sobre la implantación y liberación de todos los DVD del dispositivo (o cualquier otra necesidad que requiera proteínas de unión de DVD frescas adicionales, incluyendo el

envejecimiento y la desnaturalización de la proteína de unión de DVD ya cargada) el dispositivo podría ser recargado por la administración sistémica de proteína de unión de DVD fresca para el paciente, donde la proteína de unión de DVD está diseñada para unirse a un objetivo de interés (una citoquina, un marcador de superficie celular (como CD34) etc.) con un conjunto de sitios de unión y a un objetivo cubierto en el dispositivo (incluyendo una proteína, un epítope de cualquier tipo, incluyendo pero no limitado a lípidos, polisacáridos y polímeros) con el otro. Esta tecnología tiene la ventaja de ampliar la utilidad de los implantes recubiertos.

C) Uso de proteínas de unión de DVD en diversas enfermedades

Las moléculas de proteína de unión de DVD proporcionadas aquí también son útiles como moléculas terapéuticas para tratar diversas enfermedades. Estas moléculas de DVD pueden unirse a uno o más objetivos involucrados en una enfermedad específica. A continuación se describen ejemplos de tales objetivos en diversas enfermedades.

1) Respuesta humana de autoinmune e inflamatoria

TNF juega un papel fundamental en la patología asociada con una variedad de enfermedades que implican elementos inmunes e inflamatorios, como enfermedades autoinmunes, especialmente aquellas asociados con la inflamación, incluyendo la enfermedad de Crohn, psoriasis (incluida la psoriasis en placa), artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis psorática, osteoartritis o artritis idiopática juvenil), esclerosis múltiple y espondilitis anquilosante. Por lo tanto, las proteínas de unión en este documento pueden utilizarse para el tratamiento de estos trastornos. También están involucradas en condiciones inflamatorias y/o autoinmunes de diversos órganos. IL-17 se ha relacionado con muchas enfermedades relacionadas inmunes/autoinmunes incluyendo artritis reumatoide, asma, lupus, rechazo de aloinjertos e inmunidad antitumoral.

2) Asma

Asma alérgica se caracteriza por la presencia de eosinofilia,

metaplasia de células caliciformes, alteraciones de células epiteliales, hiper-reactividad de las vías respiratorias (AHR) y expresión de citoquinas Th2 y Th1, así como los niveles de IgE de suero elevado. Ahora es ampliamente aceptado que la inflamación de las vías respiratorias es el factor clave subyacente a la patogénesis del asma, que implica una compleja interacción de células inflamatorias tales como las células T, células B, eosinófilos, mastocitos y macrófagos y de sus mediadores secretados incluyendo citoquinas y quimioquinas. Los corticosteroides son el tratamiento anti-inflamatorio más importante para el asma en la actualidad, sin embargo, su mecanismo de acción es inespecífico y existen preocupaciones de seguridad, especialmente en la población de pacientes menores. El desarrollo de tratamientos más específicos y dirigidos por lo tanto, está garantizado.

TNF-α puede amplificar la respuesta inflamatoria en el asma y puede estar relacionado con la severidad de la enfermedad (McDonnell et al. (2001) Progress Respir. Res. 31:247-250.).

Modelos animales como el modelo de ratón con asma inducida por OVA, donde la inflamación y AHR pueden evaluarse, son conocidos en la técnica y pueden utilizarse para determinar la capacidad de varias moléculas de proteína de unión de DVD para tratar el asma.

3) Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR), una enfermedad sistémica, se caracteriza por una reacción inflamatoria crónica en la sinovial de las articulaciones y se asocia con la degeneración del cartílago y la erosión del hueso juxta-articular. Muchas citoquinas pro-inflamatorias incluyendo TNF, quimioquinas y factores de crecimiento se expresan en las articulaciones enfermas. La administración sistémica de anticuerpo anti-TNF o proteína de fusión de sTNFR para modelos de ratón de RA demostró ser protectora anti-inflamatorio y de las articulaciones. Investigaciones clínicas en la que la actividad de TNF en pacientes con RA fue bloqueada con por infliximab administrada por vía intravenosa (Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:I61-4), un mAb

anti-TNF quimérico, ha proporcionado pruebas que TNF regula la IL-6, IL-8, MCP-1, y producción de VEGF, reclutamiento de células inmunes e inflamatorias en las articulaciones, angiogénesis y reducción de los niveles sanguíneos de metaloproteinasas-1 y -3 de matriz. Una mejor comprensión de la vía inflamatoria en la artritis reumatoide ha llevado a la identificación de otros objetivos terapéuticos implicados en la artritis reumatoide. Tratamientos prometedores como antagonistas de interleucina-6 (anticuerpo de receptor de IL-6 MRA, desarrollado por Chugai, Roche (Nishimoto, Norihiro et al. (2004) Arthritis Rheum. 50(6):1761-1769), CTLA4Ig (abatacept, Genovese et al. (2005) N. Engl. J. Med. 353:1114-23.), y terapia celular anti-B (rituximab, Okamoto y Kamatani (2004) N. Engl. J. Med 351:1909) ya se ha probado en ensayos controlados aleatorios durante el año pasado. Otras citoquinas han sido identificadas y han demostrado ser de beneficio en modelos animales, incluyendo la interleucina-15 (anticuerpo terapéutico HuMax-IL_15, AMG 714 ver Baslund et al (2005) Arthritis Rheum. 52(9): 2686-2692), interleucina-17 e interleucina-18, y se están realizando ensayos clínicos de estos agentes actualmente. Terapia de anticuerpo específico dual, combinando anti-TNF y otro mediador, tiene un gran potencial en la mejora de la eficacia clínica y/o cobertura del paciente. Por ejemplo, bloqueo de TNF y VEGF puede potencialmente erradicar la inflamación y angiogénesis, los cuales están involucrados en la fisiopatología de AR. El bloqueo de otros pares de objetivos involucrados en RA, incluyendo, pero sin limitarse a, TNF e IL-18; TNF e IL-12; TNF e IL-23; TNF e IL-1beta; TNF y MIF; TNF e IL-17; y TNF e IL-15 con proteína específica de unión de DVD también se contemplan. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estos pares objetivo, pruebas específicas para el grado de inmunosupresión pueden ser garantizadas y útiles en la selección de los mejores pares objetivo (véase Luster et al (1994) Toxicology 92(1-3):229-43). Si una molécula de proteína de unión de DVD será útil para el tratamiento de la artritis reumatoide puede evaluarse utilizando modelos preclínicos de RA de animales como el modelo de ratón de artritis inducida por colágeno. Otros modelos útiles también se conocen bien en la técnica (véase Brand (2005) Comp. Med. 55(2):114-22). Basado en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para estudios

de validación de otólogos humanos y de ratón (por ejemplo, reactividad para TNF humano y de ratón, IL-15 humano y de ratón, etc.) en el modelo de ratón CIA pueden realizarse con moléculas de la proteína de unión de DVD derivadas de "anticuerpo suplente coincidente"; brevemente, una proteína de unión de DVD basada en dos (o más) anticuerpos específicos objetivo del ratón puede ajustarse a la medida de lo posible a las características de los anticuerpos humanos o humanizados parentales utilizados para la construcción de proteína humana de unión de DVD (afinidad similar, potencia de neutralización similares, vida media similar etc.).

4) Lupus eritematoso sistémico (SLE)

El sello de inmunopatogénico del lupus eritematoso sistémico es la activación policlonal de células B, lo que conduce a la hiperglobulinemia, la producción de auto-anticuerpos y la formación de complejos inmune. La anormalidad fundamental parece ser el fracaso de las células T para suprimir los clones de célula B prohibida debido a la generalizada no regulación de células T. Además, la interacción de células B y T es facilitada por varias citoquinas como IL-10 así como moléculas co-estimuladoras tal como CD40 y CD40L, B7 y CD28 y CTLA-4, que inician la segunda señal. Estas interacciones junto con aclarado fagocítico afectado de complejos inmunes y material apoptótico, perpetúan la respuesta inmune con lesión tisular resultante. SLE es considerado un Th-2 impulsado por enfermedad con elevaciones documentadas en suero IL-4, IL-6, IL-10. Proteínas de unión de DVD capaces de unir uno o más objetivos tales como, por ejemplo IL-4, IL-6, IL-10, IFN-α o TNF-α también se contemplan. La combinación de objetivos discutidos aquí mejorará la eficacia terapéutica para SLE que puede probarse en un número de modelos preclínicos de lupus (véase Peng (2004) Methods Mol. Med 102:227-72). Basado en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para estudios de validación de otólogos humanos y de ratón (por ejemplo, reactividad para CD20 humano y de ratón, interferón alfa humano y de ratón etc.) en un modelo de lupus de ratón se pueden conducir con moléculas de proteína de unión de DVD "anticuerpo suplente coincidente";

brevemente, una proteína de unión de DVD basada en dos (o más) anticuerpos específicos de ratón objetivo pueden ajustarse a la medida de lo posible a las características de los anticuerpos humanos o humanizados parentales utilizados para construcción de proteína humana de unión de DVD (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar etc.).

5) Esclerosis múltiple

Esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad de tipo autoinmune humana compleja con una etiología desconocida predominantemente. Destrucción inmunológica de la proteína básica de mielina (MBP) en todo el sistema nervioso es la principal patología de la esclerosis múltiple. MS es una enfermedad de patologías complejas, que implica la infiltración por células T CD4+ y CD8+ y de respuesta en el sistema nervioso central. La expresión en el CNS de citoquinas, especies de nitrógeno reactivo y moléculas co-estimuladoras se han descrito en MS. De consideración importante son los mecanismos inmunológicos que contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad. En particular, la expresión del antígeno, interacciones de citoquinas y de leucocitos y células T reguladoras, que ayudan a equilibrar/modular otras células T como las células Th1 y Th2, son áreas importantes para la identificación del objetivo terapéutico.

TWEAK es un miembro de la familia de TNF, se expresa constitutivamente en el sistema nervioso central (CNS), con efectos pro-inflamatorios, proliferativos o apoptóticos dependiendo de los tipos celulares. Su receptor, Fn14, se expresa en CNS por células endoteliales, astrocitos reactivos y neuronas. TWEAK y expresión de ARNm Fn14 aumentan en la médula espinal durante la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). Tratamiento de anticuerpo anti-TWEAK en la glicoproteína de mielina oligodendrocito (MOG) inducida por EAE en ratones C57BL/6 resultó en una reducción de la severidad de la enfermedad e infiltración de leucocitos cuando los ratones fueron tratados después de la fase de iniciación.

En una modalidad, moléculas de DVD Ig capaces de unir uno o más, por ejemplo dos, objetivos tales como, por ejemplo, IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13,

CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFNgamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52 o CCR2 son proporcionados. Una modalidad incluye un anti-IL-12 específico dual/TWEAK DVD Ig como un agente terapéutico beneficioso para el tratamiento de MS.

Varios modelos animales para evaluar la utilidad de las moléculas de DVD para tratar MS son conocidos en la técnica basados en la reactividad cruzada de los anticuerpos parentales para estudios de validación de otólogos de especies humanas y de ratón (por ejemplo, la reactividad para IL-12 humana y de ratón, TWEAK humano y ratón etc.) en el modelo de ratón EAE pueden llevarse a cabo con moléculas de proteína de unión de DVD derivada de "anticuerpo suplente coincidente"; brevemente, una proteína de unión de DVD basada en dos (o más) anticuerpos específicos de objetivo de ratón puede ajustarse a la medida de lo posible a las características de los anticuerpos humanos o humanizados parentales utilizados para construcción de proteína humana de unión de DVD (afinidad similar, potencia de neutralización similar, vida media similar etc.). El mismo concepto se aplica a los modelos animales en otras especies no roedores, donde una proteína de unión de DVD derivada de "anticuerpo suplente coincidente" se puede seleccionar para la farmacología anticipada y posiblemente estudios de seguridad. Además de las evaluaciones de seguridad de rutina de estas pruebas específicas de pares para el grado de inmunosupresión pueden ser garantizadas y útiles en la selección de los mejores pares de destino (véase luster et al (1994) Toxicol. 92(1-3)).

MS sin embargo no es sólo una enfermedad imunológica, pero tiene un componente neurodegenerativo muy importante. La progresión de la enfermedad en MS es debido a la pérdida acumulada y el daño de axones y los puntajes de la enfermedad final de los pacientes están determinados por estos procesos neurodegenerativos (Compston y Coles (2008) Lancet 372:1502-1517; Trapp y Nave (2008) Annu.Rev Neurosci. 31:247-269). Varios mecanismos pueden contar para el daño axonal en MS. La liberación excesiva del neurotransmisor glutamato con neurotoxicidad asociada mediada con calcio, liberación de óxido nítrico y daño posterior de axon, pérdida de soporte neurotrófico, acumulación

masiva de moléculas inhibidoras de crecimiento del axón o repulsivas tipo RGM A, NOGO A, Semaforinas, Efrinas, pueden contribuir a neurodegeneración dirigida por axón y pérdida de la regeneración de axón exitosa. Direccionamiento en actividades neutralizantes de molécula de proteína de unión de DVD sencilla dirigida contra componentes tipo RGM A, NOGO A, Semaforinas, Efrinas con actividades neutralizantes dirigidas contra citoquinas pro-inflamatorias tipo IL-12, TWEAK, IL-23, CXCL13, CD40, CD40L, IL-18, VEGF, VLA-4, TNF, CD45RB, CD200, IFNgamma, GM-CSF, FGF, C5, CD52 y CCR2 pueden permitir el enfoque simultáneo en inflamación y neuro-regeneración, un objetivo aún no alcanzado por cualquiera de los actuales principios terapéuticos de MS. La estimulación de la neuro-regeneración puede compensar las deficiencias funcionales causadas por la neurodegeneración axonal masiva observada en MS, posibilitando la recuperación de las funciones cerebrales perdidas posibles.

6) Sepsis

La fisiopatología de la sepsis es iniciada por los componentes de la membrana externa de organismos gram-negativo (lipopolisacárido [LPS], lípido A, endotoxina) y organismos gram-positivo (ácido lipoteicoico, peptidoglicano). Estos componentes de la membrana externa son capaces de unirse al receptor CD14 en la superficie de monocitos. En virtud de los receptores tipo toll recientemente descritos, entonces se transmite una señal a la célula, llevando a la eventual producción de las citoquinas pro-inflamatorias factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y la interleucina-1 (IL-1). Respuestas inflamatorias e inmunes abrumadoras son características esenciales del shock séptico y desempeñan un papel central en la patogenia de daño tisular, insuficiencia de múltiples órganos, y la muerte inducida por sepsis. Citoquinas, especialmente el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina (IL-1), han demostrado ser mediadores del shock séptico. Estas citoquinas tienen un efecto tóxico directo sobre los tejidos; también activan la fosfolipasa A2. Estos y otros efectos conducen a un aumento de las concentraciones del factor de activación de plaquetas, promoción de la actividad de óxido nítrico sintasa, promoción de la infiltración de tejido por neutrófilos y

promoción de la actividad de neutrófilo.

El tratamiento de sepsis y shock séptico sigue siendo un enigma clínico y recientes ensayos prospectivos con modificadores de respuesta biológica (es decir, anti-TNF, anti-MIF) dirigidos a la respuesta inflamatoria han mostrado sólo un modesto beneficio clínico. Recientemente, el interés se ha desplazado hacia terapias dirigidas a revertir los períodos acompañantes de inmunosupresión. En animales de experimentación, no sólo el tratamiento con inhibidores de apoptosis puede prevenir la apoptosis de células linfoides; también puede mejorar el resultado. Aunque ensayos clínicos con agentes anti-apoptóticos permanecen distantes debido en gran parte a las dificultades técnicas asociadas a su administración y direccionamiento de tejidos, inhibición de apoptosis de linfocitos representa un atractivo objetivo terapéutico para el paciente séptico. Asimismo, un agente específico dual de direccionamiento del mediador inflamatorio y mediador de apoptosis, puede tener beneficio agregado. Una modalidad pertenece a proteínas de unión de DVD capaces de enlazar uno o más objetivos involucrados en la sepsis, en una modalidad dos objetivos, tales como, por ejemplo TNF e IL-17. La eficacia de dicha proteína de unión de DVD para sepsis puede evaluarse en modelos animales preclínicos conocidos en la técnica (ver Buras et al. (2005) Nat. Rev. Drug Discover. 4(10): 854-65 y Calandra et al., (2000) Nat. Med. 6(2):164-70).

7) Trastornos neurológicos

(a) enfermedades neurodegenerativas

Enfermedades neurodegenerativas son crónicas en cuyo caso son usualmente dependientes de la edad o agudas (por ejemplo, apoplejía, lesión cerebral traumática, lesión medular, etc.). Estas enfermedades neurodegenerativas crónicas representan una compleja interacción entre múltiples tipos de células y mediadores. Estrategias de tratamiento para estas enfermedades son limitadas y en su mayoría constituyen ambos procesos inflamatorios de bloqueo con agentes antiinflamatorios no específicos (por ejemplo, corticosteroides, inhibidores de COX) o agentes para prevenir la pérdida de neuronas y/o funciones sinápticas. Estos

tratamientos no detienen la progresión de la enfermedad. Estudios recientes sugieren que más terapias dirigidas como anticuerpos a péptido A-b soluble (incluyendo las formas oligoméricas A-b) no sólo pueden ayudar a detener la progresión de la enfermedad pero puede ayudar a mantener la memoria y otras funciones cognitivas. Estas observaciones preliminares indican que terapias específicas de direccionamiento de más de un mediador de la enfermedad (por ejemplo, A-b y una citoquina pro-inflamatoria como TNF) pueden proporcionar incluso una mejor eficacia terapéutica para enfermedades neurodegenerativas crónicas a lo observado con direccionamiento de un mecanismo sencillo de la enfermedad (por ejemplo, soluble A-b solamente).

Las moléculas de proteína de unión de DVD proporcionadas aquí pueden enlazar uno o más objetivos involucrados en enfermedades crónicas neurodegenerativas como el Alzheimer. Estos objetivos incluyen, pero no se limitan a, cualquier mediador, soluble o superficie de la célula, implicado en la patogénesis de AD por ejemplo, AGE (S100 A, anfoterina), citoquinas pro-inflamatorias (po ejemplo, IL-1), quimioquinas (por ejemplo, MCP 1), moléculas que inhiben la regeneración de los nervios (por ejemplo, Nogo, RGM A), moléculas que favorecen el crecimiento de la neurita (neurotrofinas) y moléculas que pueden mediar el transporte en la barrera sangre-cerebro (por ejemplo, receptor de transferrina, receptor de insulina o RAGE). La eficacia de las moléculas de proteína de unión de DVD se puede validar en estudios pre-clínicos de modelos animales como los ratones transgénicos que sobre-expresan la proteína precursora amiloide o RAGE y desarrollan síntomas similares a la enfermedad de Alzheimer. Además, las moléculas de proteína de unión de DVD pueden ser construidas y probadas para la eficacia en los modelos animales y la mejor proteína de unión de DVD terapéutica puede seleccionarse para la prueba en pacientes humanos. Las moléculas de proteína de unión de DVD también pueden ser empleadas para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. Alfa-sinucleína participa en la patología de Parkinson. Las moléculas de proteína de unión de DVD capaces de dirigir alfa-sinucleína y mediadores inflamatorios tales como TNF, IL-1, MCP-1 puede resultar una terapia eficaz para la enfermedad de

Parkinson y también son modalidades.

Alternativamente una proteína de unión de DVD capaz de dirigir alfa-sinucleína y RGM A no sólo podría frenar el progreso patológico en la sustancia negra de los pacientes de enfermedad de Parkinson pero también puede resultar en el crecimiento regenerador de neuritas dañadas porque RGM A ha demostrado recientemente que es fuertemente sobre-regulada en esta área en los pacientes PD (Bossers et al (2009) Brain Pathol. 19:91-107).

(b) Regeneración neuronal y lesiones de la médula espinal

A pesar del incremento en el conocimiento de los mecanismos patológicos, la lesión de la médula espinal (SCI) sigue siendo una enfermedad devastadora y representa una indicación médica caracterizada por una alta necesidad médica. No existe ningún tratamiento satisfactorio y la inyección de bolo de altas dosis de metilprednisolona (MP) es la única terapia utilizada dentro de una ventana de tiempo estrecha de lesiones después de 8 horas. Este tratamiento, sin embargo, es únicamente para prevenir la lesión secundaria sin causar cualquier recuperación funcional significativa. Es fuertemente criticado por la falta de eficacia inequívoca y efectos adversos graves, como la inmunosupresión con posteriores infecciones y alteraciones musculares histopatológicos severos. No se han aprobado fármacos, biológicos o pequeñas moléculas, estimulando el potencial regenerador endógeno, pero principios de tratamiento prometedores y fármacos candidatos han demostrado eficacia en modelos animales de SCI en recientes años y primero datos clínicos prometedores se han presentado recientemente. En gran medida la falta de recuperación funcional en SCI humana es causada por factores que inhiben el crecimiento de la neurita, en sitios de lesión, en el tejido de la cicatriz, en mielina así como en las células asociadas con lesiones. Estos factores son las proteínas asociadas con mielina NogoA, OMgp y MAG, RGM A, la CSPG asociada con la cicatriz (proteoglicanos de condroitina sulfato) y factores inhibitorios en astrocitos reactivos (algunas semaforinas y efrinas). Sin embargo, en el sitio de la lesión no sólo se encuentran moléculas inhibidoras del crecimiento sino también factores estimulantes del crecimiento de neurita como neurotrofinas,

laminina, L1 y otros. Este conjunto de moléculas neurita inhibitoria de crecimiento y promotoras de crecimiento pueden explicar el bloqueo de factores individuales, como NogoA o RGM A, resultó en recuperación funcional significativa en modelos de roedores SCI, debido a una reducción de las influencias inhibidoras podría inclinar la balanza de la inhibición del crecimiento a la promoción del crecimiento. Sin embargo, las recuperaciones que se observaron con el bloqueo de una molécula inhibidora de sobre-crecimiento de neurita no fueron completas. Para lograr recuperaciones más rápidas y más pronunciadas bloqueando dos moléculas inhibidoras de sobre-crecimiento de neurita por ejemplo, Nogo y RGM A, o bloqueo de una molécula inhibidora de sobre-crecimiento de neurita y mejorar las funciones de una molécula de mejora de sobre-crecimiento de neurita, por ejemplo Nogo y neurotrofinas o bloqueo de una molécula inhibitoria sobre-crecimiento de neurita, por ejemplo Nogo y una molécula pro-inflamatoria por ejemplo, TNF, puede ser deseable (ver McGee et al., (2003) Trends Neurosci. 26:193).

En un aspecto, proteínas de unión de DVD capaces de unir pares objetivo tal como NgR y RGM A; NogoA y RGM A; MAG y RGM A; OMGp y RGM A; RGM A y RGM B; RGM A y Semaforina 3A; RGM A y Semaforina 4; CSPGs y RGM A; agrecano, midquina, neurocan, versican, fosfacan, Te38 y TNF-α; anticuerpos específicos de Aß globulómeros combinados con anticuerpos que promueven el brote de dendrita y axón se proporcionan. Daños de patología y axón dendrita, o distrofia neurítica son un signo muy temprano de AD y es conocido que NOGO A restringe el crecimiento de dendrita y que las otras moléculas asociadas a mielina y mencionados antes por ejemplo, RGM A, MAG, re-crecimiento axonal deteriorado OMGp. Uno puede combinar este tipo de ab con cualquiera de SCI-candidato (proteínas de mielina) Ab. Otros objetivos de proteína de enlace de DVD pueden incluir cualquier combinación de NgR-p75, NgR-Troy, NgR-Nogo66 (Nogo), NgR-Lingo Lingo-Troy, Lingo-p75, MAG u Omgp. Además, los objetivos también pueden incluir cualquier mediador, soluble o superficie de la célula, implicada en la inhibición de neurita, por ejemplo, Nogo, Ompg, MAG, RGM A, semaforinas, efrinas, a-b soluble, citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IL-1), moléculas quimiocinas (por ejemplo, MIP 1a) que inhiben la regeneración de los nervios. La

eficacia de anti-nogo/anti-RGM A o moléculas de la proteína de unión de DVD similares pueden validarse en modelos animales preclínicos de lesiones de la médula espinal. Además, estas moléculas de proteína de unión de DVD pueden ser construidas y probadas para la eficacia en los modelos animales y la mejor proteína de unión de DVD terapéutica puede seleccionarse para la prueba en pacientes humanos. Además, las moléculas de proteína de unión de DVD se pueden construir para dirigir dos sitios de unión de ligando distintos en un solo receptor, por ejemplo, el receptor Nogo que une tres ligandos Nogo, OMGp y MAG y RAGE que une A-b y S100 A. Además, inhibidores de crecimiento de neurita, por ejemplo, nogo y receptor nogo, también desempeñan un papel en la prevención de la regeneración de los nervios en enfermedades inmunológicas como la esclerosis múltiple. Inhibición de la interacción del receptor nogo-nogo ha demostrado que mejora la recuperación en modelos animales de esclerosis múltiple. Por lo tanto, moléculas de proteína de unión de DVD que pueden bloquear la función de un mediador inmune por ejemplo, una citoquina como IL-12 y una molécula inhibidora de crecimiento de neurita, por ejemplo, nogo o RGM pueden ofrecer una eficacia más rápida y mayor que el bloqueo de una molécula inhibidora inmune y de crecimiento de neurita sola.

En general, los anticuerpos no cruzan la barrera sangre-cerebro (BBB) de manera eficaz y pertinente. Sin embargo, en ciertas enfermedades neurológicas, por ejemplo, accidente cerebrovascular, lesión traumática del cerebro, esclerosis múltiple, etc., la BBB puede verse comprometida y permite mayor penetración de las proteínas de unión de DVD y anticuerpos en el cerebro. En otras condiciones neurológicas, cuando no se produce salida de BBB, uno puede emplear el direccionamiento de los sistemas de transporte endógeno, incluyendo transportadores mediados por portador como portadores de glucosa y aminoácidos y estructuras/receptores de células que median la trancitosis mediada por los receptores en el endotelio vascular de la BBB, permitiendo así el transporte trans-BBB de la proteína de unión de DVD. Estructuras en la BBB permitiendo este tipo de transporte incluyen pero no se limitan al receptor de insulina, receptor de transferrina, LRP y RAGE. Además, las estrategias permiten el uso de proteínas de

unión de DVD también como lanzaderas para transportar medicamentos potenciales en el sistema nervioso central incluyendo los fármacos de bajo peso molecular, nanopartículas y ácidos nucleicos (Coloma et al., (2000) Pharm Res. 17 (3): 266-74; Boado et al (2007). Bioconjug. Chem 18(2):447-55).

8) Trastornos oncológicos

Terapia de anticuerpo monoclonal ha emergido como una importante modalidad terapéutica para el cáncer (von Mehren et al (2003) Annu. Rev. Med 54:343-69). Anticuerpos pueden ejercer efectos antitumorales por inducir apoptosis, citotoxicidad redireccionada, interferencia con las interacciones ligando-receptor, o previniendo la expresión de proteínas que son críticas para el fenotipo neoplásico. Además, los anticuerpos pueden dirigir los componentes del microambiente tumoral, perturbación de las estructuras vitales como la formación de la vasculatura tumoral asociada. Los anticuerpos también pueden dirigir los receptores cuyos ligandos son factores de crecimiento, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico. El anticuerpo inhibe así los ligandos naturales que estimulan el crecimiento celular de enlace a las células tumorales dirigidas. Alternativamente, los anticuerpos pueden inducir una red anti-idiotipo, citotoxicidad mediada por el complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El uso de anticuerpos específicos duales que dirige dos mediadores independientes tumorales probablemente dará beneficio adicional en comparación con una terapia mono-específica.

IV) composiciones farmacéuticas

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de unión y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de unión proporcionadas aquí son para uso en, pero sin limitación a, diagnóstico, detección o vigilancia de un trastorno, en la prevención, tratamiento, manejo o mejoramiento de un trastorno o uno o más de sus síntomas, y/o en la investigación. En una modalidad específica, una composición consta de uno o más proteínas de unión proporcionadas aquí. En

otra modalidad, la composición farmacéutica comprende una o más proteínas de unión proporcionadas aquí y uno o varios agentes profilácticos o terapéuticos diferentes a las proteínas de unión proporcionadas aquí para tratar un trastorno. En una modalidad, los agentes profilácticos o terapéuticos conocidos por ser útiles para o que se han o se están utilizando actualmente en la prevención, tratamiento, manejo o mejoramiento de un trastorno o uno o más de sus síntomas. Según estas modalidades, la composición puede abarcar además un portador, diluyente o excipiente.

Las proteínas de unión proporcionadas aquí pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas convenientes para la administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende una proteína de unión proporcionada aquí y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes anti-bacterianos y anti-micóticos, isotónicos y agentes dilatorios de absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En algunas modalidades, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol o cloruro de sodio, se incluyen en la composición. Portadores farmacéuticamente aceptables pueden comprender además pequeñas cantidades de sustancias auxiliares como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o reguladores de pH, que refuerzan la vida de anaquel o eficacia del anticuerpo o porción de unión del anticuerpo.

Varios sistemas de entrega son conocidos y pueden usarse para administrar uno o más anticuerpos proporcionados aquí o la combinación de uno o más anticuerpos proporcionados en este documento y un agente profiláctico o agente terapéutico útil para la prevención, manejo, tratamiento, o mejoramiento de un trastorno o uno o más de sus síntomas, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpos, endocitosis mediada por el

receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Métodos de administración de un agente profiláctico o terapéutico proporcionado aquí incluyen, pero no se limitan a la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidurala, administración intratumoral y administración mucosal (por ejemplo, rutas intranasales y orales). Además, la administración pulmonar puede ser empleada, por ejemplo, por el uso de un inhalador o nebulizador y formulación con un agente aerosolizante. Véase, por ejemplo, Patente de EUA No. 6,019,968. En una modalidad, una proteína de unión proporcionada aquí, la terapia combinada, o una composición proporcionada aquí es administrada mediante la tecnología de entrega de fármacos pulmonar Alkermes® (Alkermes, Inc., Cambridge, Massachusetts). En una modalidad específica, agentes profilácticos o terapéuticos proporcionados aquí son administrados por vía intramuscular, por vía intravenosa, intratumoralmente, por vía oral, intranasal, pulmonar, o por vía subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección de bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser local o sistémica.

En una modalidad, la unión específica de nanotubos de carbono acoplados a anticuerpo (CNTs) a las células tumorales in vitro, seguido de su ablación altamente específica con luz casi infrarroja (NIR) puede utilizarse para dirigir las células tumorales. Por ejemplo, los lípidos polares biotinilados pueden utilizarse para preparar dispersiones CNT estables, biocompatibles, no citotóxicos y que están unidas a una o dos proteínas de unión de DVD derivadas de avidina neutralita diferentes dirigidas contra uno o más antígenos tumorales (por ejemplo, CD22) (Chakravarty et al., (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:8697-8702.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos estipulados aquí localmente en el área que

necesitan tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo y no por la forma de limitación, infusión local, por inyección o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso o no poroso, incluyendo las membranas y matrices, tales como las membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®) o matrices de colágeno. En una modalidad, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos proporciona aquí antagonistas es administrada localmente en el área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o un síntoma del mismo. En otra modalidad, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos provistos aquí es administrada localmente en el área afectada en combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (por ejemplo, uno o más profilácticos o agentes terapéuticos) que no sea una proteína proporcionada aquí a un sujeto para evitar, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o uno o más de sus síntomas.

En otra modalidad, el agente profiláctico o terapéutico puede ser entregado en un sistema de liberación sostenida o de liberación controlada. En una modalidad, puede utilizarse una bomba para lograr liberación controlada o sostenido (véase Langer, supra; Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al. (1980) Sugery 88:507; Saudek et al (1989) N. Engl. J. Med. 321:574). En otra modalidad, materiales poliméricos pueden utilizarse para lograr liberación controlada o sostenido de las terapias. En una modalidad, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable en almacenamiento, estéril y biodegradable. En otra modalidad aún, un sistema de liberación controlada o sostenida puede colocarse en la proximidad del objetivo profiláctico o terapéutico, por lo que requiere sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión por Langer (1990) Science 249:1527-1533). Cualquier técnica conocida por uno con habilidad en la técnica puede utilizarse para producir formulaciones de liberación sostenida que comprende uno o más agentes terapéuticos proporcionados aquí.

En una modalidad específica, cuando la composición es un ácido

nucleico de codificación de un agente profiláctico o terapéutico, el ácido nucleico puede ser administrado in vivo para promover la expresión de su agente profiláctico o agente terapéutico codificado, mediante su construcción como parte de un vector de expresión adecuada de ácido nucleico y se administración de manera tal que resulta intracelular, por ejemplo, por medio de un vector retroviral (ver la Patente de EUA No. 4,980,286), o por inyección directa, o por uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolistic, Dupont), o capa con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o por su administración en el enlace a un péptido tipo homeobox que es conocido para entrar en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868). Alternativamente, un ácido nucleico puede ser introducido intracelularmente e incorporado dentro del ADN de célula huésped para la expresión por recombinación homóloga.

Una composición farmacéutica provista aquí está formulada para ser compatible con su ruta prevista de administración. Cuando es útil, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico local como lignocamina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

El método puede abarcar la administración de una composición formulada para la administración parenteral por medio de inyección (por ejemplo, mediante la inyección de bolo o infusión continua). Formulaciones para la inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en envases multi-dosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar esas formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener a agentes formulatorios como suspensión, estabilización y/o agentes de dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en la forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua libre de pirógenos estériles) antes de su uso.

Los métodos provistos en el presente documento pueden comprender además la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Tales formulaciones de accionamiento largo pueden ser administradas por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección

intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Los métodos proporcionados aquí incluyen la administración de composiciones formuladas como formas neutras o sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como aquellas derivadas de clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, ácidos tartáricos, etc. y aquellas formadas con cationes tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

En general, los ingredientes de las composiciones son suministrados por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o saco indicando la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es la infusión, la composición puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. Cuando el modo de administración es por inyección, una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina puede ser proporcionada para que se puedan mezclar los ingredientes antes de la administración.

En una modalidad, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas proporcionados aquí viene en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o saco indicando la cantidad del agente. En una modalidad, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas proporcionados aquí se suministran como un polvo seco esterilizado liofilizado esterilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado y puede ser reconstituido (por ejemplo, con agua o solución salina) a la concentración adecuada para la administración a un sujeto. En una modalidad, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí se suministran

como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado en una dosis unitaria de por lo menos 5 mg, por lo menos 10 mg, por lo menos 15 mg, por lo menos 25 mg, por lo menos 35 mg, por lo menos 45 mg, al menos 50 mg, por lo menos 75 mg, o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizado o composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí pueden conservarse entre 2°C y 8°C en su envase original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí pueden ser administrados dentro de 1 semana, por ejemplo, dentro de 5 días, dentro de 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, en 5 horas, dentro de 3 horas o dentro de 1 hora después de ser reconstituida. En una modalidad alternativa, uno o varios de los agentes profilácticos o terapéuticos o composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente cerrado indicando la cantidad y la concentración del agente. En una modalidad, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente cerrado al menos 0.25 mg/ml, por lo menos 0.5 mg/ml, por lo menos 1 mg/ml, por lo menos 2.5 mg/ml, por lo menos 5 mg/ml, por lo menos 8 mg/ml, por lo menos 10 mg/ml, por lo menos 15 mg/kg, por lo menos 25 mg/ml, por lo menos 50 mg/ml, por lo menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida puede conservarse entre 2°C y 8°C en su envase original.

Las proteínas de unión proporcionadas aquí pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral. En una modalidad, se preparará el anticuerpo o porciones de anticuerpos como una solución inyectable que contiene 0.1-250 mg/ml de proteína de unión. La solución inyectable puede estar compuesta de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de cristal de roca o ámbar, ampolla o jeringa precargada. El regulador de pH puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5.0 a 7.0 (óptimamente pH 6.0). Otros reguladores de pH adecuados incluyen pero no están limitados a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Cloruro de sodio puede utilizarse para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de

dosificación líquida). Crioprotectores pueden incluirse para una forma de dosificación liofilizada, principalmente 0-10% sacarosa (óptimamente 0.5-1.0%). Otros crioprotectores convenientes incluyen trehalosa y lactosa. Agentes de volumen pueden incluir una forma de dosificación liofilizada, principalmente 1-10% manitol (óptimamente 2-4%). Se pueden utilizar estabilizadores en las formas de dosificación líquida y liofilizada, principalmente 1-50 mM L-metionina (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de volumen adecuados incluyen glicina, arginina, pueden ser incluidos como 0-0.05% polisorbato-80 (óptimamente 0.005-0.01%).

Agentes tensoactivos adicionales incluyen pero no se limitan a polisorbato 20 y agentes tensoactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende las proteínas de unión proporcionadas en este documento preparadas como una solución inyectable para la administración parenteral, puede comprender aún más un agente útil como un adyuvante, como aquellos utilizados para aumentar la absorción o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpos). Un adyuvante particularmente útil es hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). Además de la hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana tras la administración parenteral, especialmente la administración por vía subcutánea. También permite mayores volúmenes del sitio de inyección (es decir, más de 1 ml) con menos dolor y malestar y la mínima incidencia de reacciones del sitio de inyección (véase WO2004078140 y US2006104968).

Las composiciones contenidas pueden estar en una variedad de formas. Estos incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquida, semisólida y sólida, como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma escogida depende del modo previsto de la administración y aplicación terapéutica. Composiciones típicas están en la forma de soluciones inyectables o infusibles, como composiciones similares a aquellas utilizadas para la inmunización pasiva de los seres humanos con otros anticuerpos. El modo elegido de administración es parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad, el anticuerpo se administra por

infusión intravenosa o inyección. En otra modalidad, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

Composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada conveniente a concentración alta de fármacos. Soluciones inyectables estériles pueden ser preparadas por incorporar el compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de unión del anticuerpo) en la cantidad necesaria en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en el presente, como sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de compuestos activos en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados en este documento. En el caso de polvo liofilizado, estéril para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y secado por aspersión que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril filtrada previamente del mismo. La fluidez correcta de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de una capa como la lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerida en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensoactivos. Absorción prolongada de composiciones inyectables puede ser llevada al incluir, en la composición, un agente que retarda la absorción, por ejemplo, de sales de monoestearato y gelatina.

Las proteínas de unión proporcionadas aquí pueden ser administradas por una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, en una modalidad, la ruta/modo de administración es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como será apreciada por el artesano especializado, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas modalidades, el compuesto activo puede prepararse con un portador que protegerá el compuesto contra rápida liberación, como una formulación de liberación controlada, incluyendo

implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulado. Polímeros biodegradables, biocompatibles pueden utilizarse tal como acetato de vinilo de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son patentados o generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones. En ciertas modalidades, una proteína de unión proporcionada aquí es co-formulada con y/o co-administrada con uno o más agentes terapéuticos adicionales a los que son útiles para tratar trastornos con una proteína de unión proporcionada aquí. Por ejemplo, una proteína de unión proporcionada aquí puede ser co-formulada y/o co-administrada con uno o más anticuerpos adicionales que unen otros objetivos (por ejemplo, anticuerpos que unen otras citoquinas o que unen las moléculas de superficie celular). Además, pueden utilizarse uno o más anticuerpos proporcionados aquí en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos que preceden. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diferentes monoterapias.

En ciertas modalidades, una proteína de unión está enlazada a un vehículo de extensión de vida media conocido en la técnica. Dichos vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio de Fc, glicol de polietileno y dextrano. Se describen dichos vehículos, por ejemplo, en la Solicitud de EUA No. de serie 09/428,082 y Publicación PCT No. WO 99/25044.

En una modalidad específica, secuencias de ácido nucleico de codificación de una proteína de unión proporcionada aquí u otro agente profiláctico o terapéutico proporcionado aquí son administrados para tratar, prevenir, gestionar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas de los mismos a modo de terapia génica. Terapia génica se refiere a la terapia realizada por la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta modalidad, los ácidos

nucleicos producen su anticuerpo codificado o agente profiláctico o terapéutico proporcionado aquí que media un efecto profiláctico o terapéutico.

Cualquiera de los métodos para la terapia génica disponibles en la técnica puede ser utilizado en los métodos proporcionados en el presente. Para comentarios generales de los métodos de la terapia génica, ver Goldspiel et al., 1993. Se describen métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante, que puede utilizarse en Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993); and Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990). La descripción detallada de los diversos métodos de la terapia génica se describe en la publicación de patente No. US20050042664.

Un método para el tratamiento de un sujeto humano que sufre de un trastorno en el que el objetivo u objetivos, capaz de unirse por la proteína de unión proporcionada aquí es perjudicial, que comprende la administración al sujeto humano de una proteína de unión proporcionada aquí tal que la actividad del objetivo u objetivos en el sujeto humano se inhibe y uno o más de los síntomas es aliviado o tratamiento conseguido se proporciona. En una modalidad, enfermedades que pueden ser tratadas o diagnosticadas con las composiciones y métodos incluyen, pero no se limitan a, elementos inmunes e inflamatorios, como las enfermedades autoinmunes, particularmente aquellas asociadas con inflamación, incluyendo la enfermedad de Crohn, psoriasis (incluida la psoriasis en placa), artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis psorática, osteoartritis o artritis idiopática juvenil), esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, sepsis y enfermedades neurodegenerativas, regeneración neuronal, lesiones de la médula espinal y cánceres primarios y metastásicos. En otra modalidad, la enfermedad es un trastorno respiratorio; asma; asma alérgica y no alérgica; asma debido a una infección; asma debido a una infección con el virus respiratorio sincitial (VRS); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); una condición que involucra la inflamación de las vías respiratorias; eosinofilia; fibrosis y la producción de exceso de moco; fibrosis quística; fibrosis pulmonar; un trastorno atópico; dermatitis atópica; urticaria;

eczema; rinitis alérgica; enterogastritis alérgica; una condición autoinmune y/o inflamatoria de la piel; una condición autoinmune y/o inflamatoria de los órganos gastrointestinales; enfermedades inflamatorias intestinales (IBD); colitis ulcerativa; una condición inflamatoria y/o autoinmune del hígado; cirrosis hepática; fibrosis hepática; fibrosis hepática causada por el virus de hepatitis B y/o C; esclerodermia; tumores o cánceres; carcinoma hepatocelular; glioblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; una infección viral; una infección bacteriana; una infección parasitaria; infección por HTLV-1; supresión de la expresión de la respuesta inmune de protección tipo 1 y la supresión de la expresión de una respuesta inmune protectora tipo 1 durante la vacunación.

Una proteína de unión proporcionada en este documento también puede administrarse con uno o varios otros agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de diversas enfermedades.

Una proteína de unión proporcionada en este documento puede utilizarse sola o en combinación para tratar estas enfermedades. Debe entenderse que las proteínas de enlace pueden utilizarse solas o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, el agente adicional que ser seleccionado por los expertos en la técnica para su propósito. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica siendo útil para el tratamiento de la enfermedad o condición que es tratada por el anticuerpo proporcionado aquí. El agente adicional también puede ser un agente que imparte un atributo beneficioso a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecta la viscosidad de la composición.

Además debe entenderse que las combinaciones proporcionadas en este documento son aquellas combinaciones útiles para los fines previstos. Los agentes expuestos a continuación son para fines ilustrativos y no se pretende ser limitados. En algunas modalidades, las combinaciones comprenden los anticuerpos proporcionados y al menos un agente adicional seleccionado de la lista a continuación. La combinación también puede incluir a más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función.

Las composiciones farmacéuticas proporcionada en este documento pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de una proteína de unión proporcionada en este documento. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad en efectiva, en las dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de unión puede ser determinada por una persona experta en la técnica y puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad de la proteína de unión para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una en que cualquiera de los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o porción de unión del anticuerpo, se ponderan por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante períodos de tiempo necesaria, para lograr el resultado deseado profiláctico. Normalmente, ya que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad terapéuticamente profilácticamente eficaz será menor que la cantidad efectiva terapéuticamente.

Regímenes de dosis pueden ajustarse para proporcionar la óptima respuesta deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo único, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse proporcionalmente o aumentada según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para la facilidad de administración y uniformidad de la dosis. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutica requerida. La especificación para las formas de dosis unitarias proporcionadas aquí es dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del

compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular para lograrse y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Una gama ejemplar, no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de una proteína de unión proporcionada aquí es 0.1-20 mg/kg, por ejemplo, 1-10 mg/kg. Se debe señalar que los valores de dosis pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviarse. Se debe entender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis específica pueden ajustarse con el tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosis establecidos son ejemplares solamente y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reclamada.

V) diagnósticos

La descripción en este documento también proporciona aplicaciones de diagnóstico. Esto es dilucidado aún más posteriormente.

A. método de ensayo

La presente descripción también proporciona un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba utilizando al menos una proteína de unión de DVD como se describe en este documento. Cualquier ensayo adecuado como es conocido en la técnica se puede utilizar en el método. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo, como inmunoensayo sándwich (por ejemplo, inmunoensayos sándwich de proteínas monoclonales, policlonales y/o unión de DVD o cualquier variación de los mismos (por ejemplo, proteína monoclonal/de unión de DVD, proteína de unión de DVD/policlonal, etc.), incluyendo la detección de radioisótopos (radioinmunoensayo (RIA)) y la detección de la enzima (inmunoensayo enzimático (EIA) o ensayo inmunosorbente enlazado a la enzima (ELISA) (por ejemplo, ensayos ELISA de Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, MN))), inmunoensayo de inhibición competitiva (por ejemplo, hacia adelante e

inversa), inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA), técnica de inmunoensayo de enzima multiplicada (EMIT), transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) y ensayo quimioluminiscente homólogo, etc.. En un inmunoensayo basado en SELDI, un reactivo de captura que específicamente se une a un analito (o un fragmento del mismo) de interés está unido a la superficie de una sonda de espectrometría de masas, tal como un arreglo de chip proteína pre-activado. El analito (o un fragmento del mismo) es capturado entonces específicamente sobre el biochip y el analito capturado (o un fragmento del mismo) es detectado por espectrometría de masas. Alternativamente, el analito (o un fragmento del mismo) puede ser eluido del reactivo de captura y detectado por MALDI tradicional (desorción/ionización láser asistida por matriz) o por SELDI. Un inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente, en particular uno que emplea el analizador automatizado ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), es un ejemplo de un inmunoensayo preferido.

Métodos bien conocidos en la técnica para la recolección, manipulación y procesamiento de orina, sangre, suero y plasma y otros líquidos corporales, se utilizan en la práctica de la presente descripción, por ejemplo, cuando una proteína de unión de DVD tal como se describe en este documento se emplea como un reactivo de inmunodiagnóstico y/o en un kit de inmunoensayo de analito. La muestra de prueba puede comprender más radicales además del analito de interés, tal como anticuerpos, antígenos, haptenos, hormonas, fármacos, enzimas, receptores, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligonucleótidos y/o polinucleótidos. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre obtenida de un sujeto. Puede ser necesario o deseado que una muestra de prueba, especialmente la sangre entera, se trate antes del inmunoensayo como se describe en este documento, por ejemplo, con un reactivo de pre-tratamiento. Incluso en casos donde el tratamiento previo no es necesario (por ejemplo, la mayoría de las muestras de orina), el pre-tratamiento opcionalmente puede hacerse (por ejemplo, como parte de un régimen en una plataforma comercial).

El reactivo de pre-tratamiento puede ser cualquier reactivo apropiado

para su uso con el inmunoensayo y kits proporcionados aquí. El pre-tratamiento opcionalmente comprende: (a) uno o más solventes (por ejemplo, metanol y glicol de etileno) y, opcionalmente, sal, (b) uno o más solventes y sal y opcionalmente, detergente, (c) detergente, o (d) detergente y sal. Los reactivos de pre-tratamiento son conocidos en la técnica, y tal tratamiento previo puede emplearse, por ejemplo, para ensayos en Abbott TDx, AxSYM® y analizadores ARCHITECT® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), como se describe en la literatura (véase, por ejemplo, Clin Yatscoff et al (1990). 36:1969 Chem-1973 y Wallemacq et al. (1999). Clin. Chem. 45:432-435), y/o como comercialmente disponible. Además, puede hacerse un pre-tratamiento como se describe en la Patente de EUA No. 5,135,875 y 6,660,843; publicación de patentes europea No. EU0471293, solicitud de patente de EUA No. 20080020401. El reactivo de pre-tratamiento puede ser un agente heterogéneo o un agente homogéneo.

Con el uso de un reactivo de pre-tratamiento heterogéneo, el reactivo de pre-tratamiento precipita la proteína de unión de analito (por ejemplo, proteína que se puede enlazar a un analito o un fragmento del mismo) presentes en la muestra. Ese paso de pre-tratamiento consta de retirar cualquier proteína de unión de analito al separar de la proteína de unión de analito precipitado el sobrenadante de la mezcla formada por la adición del agente de pre-tratamiento a la muestra. En un ensayo, el sobrenadante de la mezcla ausente cualquier proteína de unión se utiliza en el ensayo, procedente directamente al paso de captura de anticuerpos.

Con el uso de un reactivo de pre-tratamiento homogéneo no hay ningún paso de separación. Toda la mezcla de la muestra de prueba y reactivo de pre-tratamiento se contactó con una pareja de unión específico etiquetado de analito (o un fragmento del mismo), tal como un anticuerpo anti-analito etiquetado (o un fragmento antigénicamente reactivo del mismo). El reactivo de pre-tratamiento empleado para tal ensayo normalmente se diluye en la mezcla de la muestra de prueba pre-tratada, antes o durante la captura por la primera pareja de unión específica. A pesar de dicha dilución, una cierta cantidad de reactivo de pre-tratamiento está todavía presente (o sigue estando) en la mezcla de la muestra de prueba durante la captura. En una modalidad, la pareja de unión específica

etiquetada puede ser una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo).

En un formato heterogéneo, después que la muestra se obtiene de un sujeto, se prepara una primera mezcla. La mezcla contiene la muestra de prueba que está siendo evaluada para un analito (o un fragmento del mismo) y una primera pareja de unión específica, en donde la primera pareja de unión específica y cualquier analito contenido en la muestra de prueba forman un primer complejo pareja-analito de unión específico. Preferentemente, la primera pareja de unión específica es un anticuerpo anti-analito o un fragmento del mismo. La primera pareja de unión específica puede ser una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo) como se describe en este documento. El orden en el que la muestra de prueba y la primera pareja de unión específica se agregan para formar la mezcla no es crítico. Preferentemente, la primera pareja de unión específica es inmovilizada sobre una fase sólida. La fase sólida utilizada en el inmunoensayo (para la primera pareja de unión específica y, opcionalmente, la segunda pareja de unión específica) puede ser cualquier fase sólida conocida en la técnica, tales como, pero no limitado a, una partícula magnética, una perla, un tubo de ensayo, una placa de microtitulación, una cubeta, una membrana, una molécula de andamio, una película, un papel de filtro, un disco y un chip.

Después que la mezcla que contiene el primer complejo de analito-pareja de unión específica, cualquier analito no unido se quitará del complejo usando cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, el analito no unido puede eliminarse mediante el lavado. Preferiblemente, sin embargo, la primera pareja de unión específica está presente en exceso de cualquier analito presente en la muestra de prueba, tal que todos los analitos que están presentes en la muestra de prueba está unida por la primera pareja de unión específica.

Después que cualquier analito no unido se remueve, una segunda pareja de unión específica se agrega a la mezcla para formar a un primer complejo de pareja de unión específica segundo analito pareja de unión específico. La segunda pareja de unión específico es preferentemente un anticuerpo anti-analito

que se une a un epítope en analito que difiere del epítope en el analito unido por la primera pareja de unión específica. Además, también preferiblemente, la segunda pareja de unión específica se etiqueta con o contiene una etiqueta detectable como se describió anteriormente. La segunda pareja de unión específica puede ser una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo) como se describe en este documento.

Puede utilizarse cualquier etiqueta detectable conveniente como es conocido en la técnica. Por ejemplo, la etiqueta detectable puede ser una etiqueta radiactiva (tal como ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, ^{32}P, y ^{33}P), una etiqueta enzimática (como peroxidasa de rábano picante, peroxidasa alcalina, glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa y similares), una etiqueta quimioluminiscente (como ésteres de acridinio, tioésteres o sulfonamidas; luminol, isoluminol, ésteres de fenantridinio y similares), una etiqueta fluorescente (como la fluoresceína (por ejemplo, 5-fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 3'6-carboxifluoresceína, 5(6)-carboxifluoresceína, 6-hexacloro-fluoresceína, 6-tetraclorofluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y similares)), rodamina, ficobiliproteínas, R-ficoeritrina, puntos cuánticos (por ejemplo, seleniuro de zinc sulfuro-tapado de cadmio), una etiqueta termométrica o una etiqueta de reacción en cadena de inmuno-polimerasa. Una introducción a las etiquetas, procedimientos de etiquetado y detección de etiquetas se encuentra en Polak y Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2^{a} ed., Springer Verlag, N.Y. (1997), y en Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996), que es un manual combinado y catálogo editado por Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon. Una etiqueta fluorescente puede utilizarse en FPIA (véase, por ejemplo, patente de EUA No. 5,593,896). Un compuesto de acridinio puede utilizarse como una etiqueta detectable en un ensayo quimioluminiscente homogéneo o heterogéneo (véase, por ejemplo, Adamczyk et al. (2006) Bioorg. Med Chem Lett. 16:1324-1328).

Un compuesto de acridinio preferido es una acridinio-9-carboxamida. Métodos para la preparación de acridinio 9-carboxamides son descritos en por ejemplo, Mattingly (1991) J. Biolumin. Chemilumin. 6:107-114. Otro compuesto

acridinio preferido es un éster de acridinio-9-carboxilato de arilo. Un ejemplo de un éster de acridinio-9-carboxilato de arilo es 10-metil-9-(fenoxicarbonil)acridinio fluorosulfonato (disponible de Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Métodos para la preparación de ésteres de arilo de 9-carboxilato de acridinio se describen en, por ejemplo, McCapra et al. (1965) Photochem. Photobiol. 4:1111-21. Más detalles sobre el éster de acridinio-9-carboxilato de arilo y su uso se establecen en la publicación de patente No. 20080248493.

Ensayos quimioluminiscentes (por ejemplo, usando acridinio como se describió anteriormente u otros agentes quimioluminiscentes) pueden realizarse según los métodos descritos en Adamczyk et al. (2006). Anal. Chim. Acta 579(1): 61-67. Si bien puede utilizarse cualquier formato de ensayo adecuado, un quimioluminómetro de microplacas (Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN) permite el ensayo de múltiples muestras de pequeños volúmenes rápidamente.

No es importante el orden en el que la muestra de prueba y la o las parejas de unión específica se agregan para formar la mezcla para el ensayo quimioluminiscente. Si la primera pareja de unión específica es etiquetado de manera detectable con un agente quimioluminiscente como un compuesto acridinio, se forman complejos pareja-analito de unión específica primero etiquetado de manera detectable. Alternativamente, si se utiliza una segunda pareja de unión específica y la segunda pareja de unión específica se etiquetada de manera perceptible con un agente quimioluminiscente como un compuesto acridinio, se forman complejos de pareja de unión específico segundo – analito – pareja de unión específica primera etiquetado de manera detectable. Cualquier pareja de unión específica no unida, etiquetada o sin etiquetar, puede extraerse de la mezcla usando cualquier técnica conocida en la técnica, tal como el lavado.

Peróxido de hidrógeno puede ser generado in situ en la mezcla o proporcionado o suministrado a la mezcla (por ejemplo, la fuente del peróxido de hidrógeno siendo uno o más reguladores de pH u otras soluciones que se saben que contienen peróxido de hidrógeno) antes, simultáneamente con, o después de la adición de un compuesto de acridio descrito antes. Peróxido de hidrógeno puede

ser generado in situ en un número de maneras como sería evidente por un experto en la técnica.

Tras la adición simultánea o posterior de al menos una solución básica a la muestra, una señal detectable, es decir, se genera una señal quimioluminiscente, indicativa de la presencia del analito. La solución básica contiene al menos una base y tiene un pH mayor o igual a 10, preferentemente, mayor o igual a 12. Ejemplos de soluciones básicas incluyen, pero no se limitan a, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio y bicarbonato de calcio. La cantidad de solución básica añadida a la muestra depende de la concentración de la solución básica. Basado en la concentración de la solución básica utilizada, un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de solución básica para añadir a la muestra.

La señal quimioluminiscente que se genera puede detectarse mediante técnicas de rutina conocidas por aquellos con experiencia en la técnica. Basado en la intensidad de la señal generada, se puede cuantificar la cantidad de analito en la muestra. Específicamente, la cantidad de analito en la muestra es proporcional a la intensidad de la señal generada. La cantidad de analito presente puede ser cuantificada mediante la comparación de la cantidad de luz generada a una curva estándar de analito o por comparación con un estándar de referencia. La curva estándar puede generarse mediante diluciones en serie o soluciones de concentraciones conocidas del analito mediante espectroscopia de masas, métodos gravimétricos y otras técnicas conocidas en la técnica. Mientras lo anterior se describe con énfasis en el uso de un compuesto acridinio como el agente quimioluminiscente, uno de experiencia en la técnica puede adaptar fácilmente esta descripción para el uso de otros agentes quimioluminiscentes.

Inmunoensayos de analito generalmente pueden llevarse a cabo utilizando cualquier formato conocido en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, un formato de sándwich. Específicamente, en un formato de inmunoensayo, por lo menos dos anticuerpos se emplean para separar y cuantificar el analito, como un analito humano, o un fragmento del mismo en una muestra. Más específicamente,

los al menos dos anticuerpos se unen a diferentes epítopes en un analito (o un fragmento del mismo) formando un complejo inmune, que se conoce como un "sándwich". En general, en los inmunoensayos uno o más anticuerpos pueden utilizarse para capturar el analito (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba (estos anticuerpos son frecuentemente denominados un anticuerpo de "captura" o anticuerpos de "captura") y uno o más anticuerpos pueden utilizarse para unir una etiqueta detectable (es decir, cuantificable) al sándwich (estos anticuerpos son frecuentemente denominados como el "anticuerpo de detección" los "anticuerpos de detección", el "conjugado", o los "conjugados"). Así, en el contexto de un formato de inmunoensayo sándwich, una proteína de unión o una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo) como se describe en este documento puede utilizarse como un anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección o ambos. Por ejemplo, una proteína de unión o proteína de unión de DVD que tiene un dominio que se puede unir a un primer epítope en un analito (o un fragmento del mismo) puede utilizarse como un agente de captura y/o otra proteína de unión o proteína de unión de DVD que tiene un dominio que puede unir un segundo epítope en un analito (o un fragmento del mismo) puede utilizarse como un agente de detección. En este sentido, una proteína de unión o una proteína de unión de DVD con un primer dominio que puede unir un primer epítope en un analito (o un fragmento del mismo) y un segundo dominio que puede unir un segundo epítope en un analito (o un fragmento del mismo) puede utilizarse como un agente de captura y/o un agente de detección. Alternativamente, una proteína de unión o proteína de unión de DVD con un primer dominio que se puede unir un epítope en un primer analito (o un fragmento del mismo) y un segundo dominio que puede unir un epítope en un segundo analito (o un fragmento del mismo) puede ser utilizado como un agente de captura y/o un agente de detección para detectar y cuantificar de manera opcional, dos o más analitos. En caso de que un analito puede estar presente en una muestra de más de una forma, tal como una forma monomérica y una forma dimérica/mulimérica, lo que puede ser homomérica o heteromérica, una proteína de unión o proteína de unión de DVD que tiene un dominio que puede unir un

epítope que sólo se expone en la forma monomérica y otra proteína de unión o proteína de unión de DVD que tiene un dominio que puede unir un epítope en una parte diferente de una forma dimérica/multimérica pueden utilizarse como agentes de captura y/o agentes de detección, lo que permite de esta manera la detección y cuantificación opcional, de diferentes formas de un analito determinado. Además, empleando proteínas de unión o proteínas de unión de DVD con afinidades diferenciales dentro de una proteína de unión sencilla o proteína de unión de DVD y/o entre proteínas de unión o proteínas de unión de DVD puede proporcionar una ventaja de avidez. En el contexto de inmunoensayos descritos en este documento, por lo general pueden ser útiles o deseados para incorporar uno o más enlazadores dentro de la estructura de una proteína de unión o una proteína de unión de DVD. Cuando está presente, óptimamente el enlazador puede ser de suficiente longitud y flexibilidad estructural para permitir la unión de un epítope por los dominios internos así como la unión de otro epítope por los dominios externos. En este sentido, cuando una proteína de unión o una proteína de unión de DVD pueden unir dos analitos diferentes y un analito es más grande que el otro, preferiblemente el analito mayor está unido por los dominios externos.

Hablando en términos generales, una muestra que se analiza para (por ejemplo, sospecha que contiene) analito (o un fragmento del mismo) puede contactarse con al menos un agente de captura (o agente) y al menos un agente de detección (que puede ser un segundo agente de detección o un tercer agente de detección o incluso un agente sucesivamente numerado, por ejemplo, donde el agente de captura y/o detección comprende varios agentes) ya sea simultáneamente o secuencialmente y en cualquier orden. Por ejemplo, la muestra de prueba puede contactarse primero con al menos un agente de captura y luego (secuencialmente) con al menos un agente de detección. Alternativamente, la muestra puede contactarse primero con al menos un gente de detección y luego (secuencialmente) con al menos un agente de captura. En otra alternativa todavía, la muestra de prueba puede contactarse al mismo tiempo con un agente de captura y un agente de detección.

En el formato de ensayo sándwich, una muestra que se sospecha

que contiene el analito (o un fragmento del mismo) es llevado primero en contacto con al menos un primer agente de captura bajo condiciones que permiten la formación de un primer complejo de agente/analito. Si se utiliza más de un agente de captura, un primer complejo agente de captura/analito compuesto por dos o más agentes de captura está formado. En un ensayo de sándwich, los agentes, es decir, preferentemente, el al menos uno agente de captura son utilizados en cantidades excesivas de molares de la máxima cantidad de analito (o un fragmento del mismo) se espera en la muestra de prueba. Por ejemplo, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 1 mg de agente por ml de regulador de pH (por ejemplo, regulador de pH de revestimiento de micropartículas) puede utilizarse.

Inmunoensayos de inhibición competitiva, que a menudo se utilizan para medir los analitos pequeños porque se requiere un enlace por sólo un anticuerpo (es decir, una proteína de unión y/o una proteína de unión de DVD en el contexto de la presente descripción), comprenden los formatos clásicos y secuenciales. En un inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial un agente de captura para un analito de interés es recubierto en un pozo de una placa de microtitulación u otro soporte sólido. Cuando se añade la muestra que contiene el analito de interés al pozo, el analito de interés se une al agente de captura. Después del lavado, una cantidad conocida de analito marcado (por ejemplo, biotina o peroxidasa de rábano picante (HRP)) capaz de unir el anticuerpo de captura se añade al pozo. Un sustrato para una etiqueta enzimática se utiliza para generar una señal. Un ejemplo de un sustrato adecuado para HRP es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Después del lavado, la señal generada por el analito etiquetado se mide y es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. En un inmunoensayo de inhibición competitiva clásico típicamente un anticuerpo (es decir, proteína de unión y/o una proteína de unión de DVD en el contexto de la presente descripción) a un analito de interés está cubierto en un soporte sólido (por ejemplo, un pozo de una placa de microtitulación). Sin embargo, a diferencia del inmunoensayo de inhibición competitiva secuencial, la muestra y el analito etiquetado se agregan al pozo al mismo tiempo. Cualquier analito en la muestra compite con el analito etiquetado para unirse al agente de

captura. Después del lavado, la señal generada por el analito etiquetado se mide y es inversamente proporcional a la cantidad de analito en la muestra. Por supuesto, hay muchas variaciones de estos formatos, por ejemplo, cuando se une con el soporte sólido tiene lugar, si el formato es un paso, dos pasos, dos pasos retardados y similares, y éstos serían reconocidos por uno con experiencia en la técnica.

Opcionalmente, antes de poner en contacto con la muestra de prueba con al menos un agente de captura (por ejemplo, el primer agente de captura), el al menos un agente de captura puede unirse a un soporte sólido, lo que facilita la separación del primer complejo agente/analito (o un fragmento del mismo) de la muestra de prueba. El sustrato al que está unido el agente de captura puede ser cualquier soporte sólido adecuado o fase sólida que facilita la separación del complejo agente de captura-analito de la muestra.

Los ejemplos incluyen un pozo de una placa, como una placa de microtitulación, un tubo de ensayo, un gel poroso (por ejemplo, gel de sílice, agarosa, dextrano o gelatina), una película polimérica (por ejemplo, poliacrilamida), perlas (por ejemplo, perlas de poliestireno o perla magnética), una tira de un filtro/membrana (por ejemplo, nitrocelulosa o nylon), micropartículas (por ejemplo, partículas de látex, micropartículas magnetizables (por ejemplo, micropartículas de óxido férrico o núcleos de óxido de cromo y capas homo- o hetero-poliméricos y radios de aproximadamente 1-10 micras). El sustrato puede constar de un material poroso adecuado con una afinidad superficial conveniente para unir antígenos y suficiente porosidad para permitir el acceso por anticuerpos de detección. Un material microporoso es generalmente preferido, aunque se puede utilizar un material gelatinoso en un estado hidratado. Dichos sustratos porosos son preferentemente en la forma de hojas con un grosor de aproximadamente 0.01 a 0.5 mm, preferentemente aproximadamente 0.1 mm. Mientras que el tamaño del poro puede variar un poco, preferiblemente el tamaño del poro es de aproximadamente 0.025 a aproximadamente 15 micras, más preferiblemente más de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 15 micras. La superficie de estos sustratos puede ser pasivamente revestida o activada por procesos químicos que

causan enlace covalente de un anticuerpo al sustrato. La unión irreversible, generalmente por adsorción a través de fuerzas hidrofóbicas, del antígeno o el anticuerpo a los resultados de sustrato; alternativamente, un agente químico de acoplamiento u otros medios pueden utilizarse para unir covalentemente el anticuerpo al sustrato, siempre que tal enlace no interfiera con la capacidad del anticuerpo para unirse al analito. Como alternativa, el anticuerpo (es decir, proteínas de unión y/o proteínas de unión de DVD en el contexto de la presente descripción) se puede unir con micropartículas, que han sido previamente cubiertas con estreptavidina (por ejemplo, Perlas Magnéticas DYNAL®, Invitrogen, Carlsbad, CA) o biotina (por ejemplo, usando micropartículas recubiertas de estreptavidina Power-BindTM-SA-MP (Seradyn, Indianápolis, IN)) o anticuerpos monoclonales anti-especie-específico (es decir, proteínas de unión y/o proteínas de unión de DVD en el contexto de la presente descripción). Si es necesario o deseado, el sustrato (por ejemplo, para la etiqueta) se puede derivar para permitir la reactividad con diferentes grupos funcionales en el anticuerpo (es decir, proteínas de unión y/o proteínas de unión de DVD en el contexto de la presente descripción). Tal derivación requiere el uso de ciertos agentes de acoplamiento, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a, anhídrido maleico, N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Si se desea, uno o más agentes de captura, como anticuerpos (o sus fragmentos) (es decir, proteínas de unión y/o proteínas de unión de DVD en el contexto de la presente descripción, cada una de las cuales es específica para el o los analitos puede acoplarse a las fases sólidas en distintas ubicaciones físicas o tratables (por ejemplo, como en una configuración de biochip (véase, por ejemplo, la patente de EUA No. 6,225,047; publicación PCT No. WO 99/51773; patente de EUA No. 6,329,209; publicación PCT No. WO 00/56934 y patente de EUA No. 5,242,828). Si el agente de captura está unido a una sonda de espectrometría de masas como el soporte sólido, la cantidad de analito unido a la sonda puede detectarse mediante espectrometría de masas de ionización de desorción de láser. Alternativamente, una sola columna puede ser empacada con diferentes perlas, que son derivadas con los uno o más agentes de captura, con lo que la captura del analito en un solo lugar (véase,

tecnologías derivadas de anticuerpos, basadas en la perla, por ejemplo, la tecnología xMAP de Luminex (Austin, TX)).

Después que la muestra de prueba se ensayo para el analito (o un fragmento del mismo) se pone en contacto con al menos un agente de captura (por ejemplo, el primer agente de captura), la mezcla se incuba para permitir la formación de un primer complejo agente de captura (o agente de captura múltiple)-analito (o un fragmento del mismo). La incubación puede realizarse en un pH de aproximadamente 4.5 a aproximadamente 10.0, a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 45°C y durante un período de por lo menos alrededor de un 1 minuto a aproximadamente dieciocho (18) horas, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 minutos, preferiblemente más de aproximadamente 4 a aproximadamente 18 minutos. El inmunoensayo descrito aquí puede realizarse en un solo paso (lo que significa la muestra de prueba, por lo menos un agente de captura y al menos un agente de detección se añaden todos secuencialmente o simultáneamente a un vaso de reacción) o en más de un paso, dos pasos, tres pasos, etc.

Después de la formación del complejo (primera o múltiple) agente de captura/analito (o un fragmento del mismo), el complejo luego se contacta con al menos un agente de detección bajo condiciones que permiten la formación de un (primero o múltiple) agente de captura/analito (o un fragmento del mismo)/ segundo complejo de agente de detección). Mientras se da título para mayor claridad como el "segundo" agente (por ejemplo, segundo agente de detección), de hecho, cuando el agente múltiple se utiliza para la captura y/o detección, el al menos un agente de detección puede ser el segundo, tercero, cuarto, etc. agentes usados en el inmunoensayo. Si el complejo agente de captura/analito (o un fragmento del mismo) es contactado con más de un agente de detección, entonces un complejo de agente de detección (primero o múltiple) agente de captura/analito (o un fragmento del mismo)/(múltiple) se forma. Como con el agente de captura (por ejemplo, el primer agente de captura), cuando al menos un agente de detección (por ejemplo, segundo y cualquiera posterior) se pone en contacto con el complejo agente de captura/analito (o un fragmento del mismo), un período de

incubación en condiciones similares a las descritas anteriormente se requiere para la formación del complejo (primero o múltiple) agente de detección/analito (o un fragmento del mismo)/(segundo o múltiple) agente de detección. Preferiblemente, por lo menos un agente de detección contiene una etiqueta detectable. La etiqueta detectable se puede enlazar con el agente de detección al menos uno (por ejemplo, el segundo agente de detección) antes, simultáneamente con o después de la formación del complejo de agente de detección del (primero o múltiple) agente de captura/analito (o un fragmento del mismo)/(segundo o múltiple). Puede utilizarse cualquier etiqueta detectable en la técnica (véase la discusión anterior, incluyendo las referencias Polak y Van Noorden (1997) y Haugland (1996)).

La etiqueta detectable puede unirse a los anticuerpos ya sea directamente o a través de un agente de acoplamiento. Un ejemplo de un agente de acoplamiento que se puede utilizar es EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato), que está disponible comercialmente de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Otros agentes de acoplamiento que se pueden utilizar son conocidos en la técnica. Métodos para la unión de una etiqueta detectable a un anticuerpo son conocidos en la técnica. Además, muchas etiquetas detectables pueden ser compradas o sintetizadas ya conteniendo grupos terminales que facilitan el acoplamiento de la etiqueta detectable al agente, como un éster de CPSP acridinio (es decir, 9-[N-tosil-N-(3-carboxipropil)]-10-(3-sulfopropil)acridinio carboxamida) o SPSP-acridinio éster (es decir, N10-(3-sulfopropil)-N-(3-sulfopropil)-acridinio-9-carboxamida).

El complejo de agente de detección (primero o múltiple) agente de captura/analito/(segundo o múltiple) puede ser, pero no debe separarse del resto de la muestra de prueba antes de la cuantificación de la etiqueta. Por ejemplo, si el agente de captura al menos uno (por ejemplo, el primer agente de captura, como una proteína de unión y/o una proteína de unión de DVD de acuerdo con la presente descripción) está unido a un soporte sólido, como un pozo o una perla, separación puede lograrse eliminando el fluido (de la muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido. Alternativamente, si el al menos un primer agente de captura está unido a un soporte sólido, se puede al mismo tiempo contactar con

la muestra que contiene el analito y el al menos un segundo agente de detección para formar un primer complejo de agente (múltiple) agente/analito/segundo (múltiple), seguido de la eliminación del fluido (muestra de prueba) del contacto con el soporte sólido. Si el al menos un primer agente de captura no está unido a un soporte sólido, entonces complejo de agente de detección (primero o múltiple) agente de captura/analito/(segundo o múltiple) no debe removerse de la muestra de prueba para la cuantificación de la cantidad de la etiqueta.

Después de la formación del complejo agente de captura7analito/agente de detección (por ejemplo, el complejo primer agente de captura/analito/segundo agente de detección), la cantidad de etiqueta en el complejo se cuantifica mediante técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, si se utiliza una etiqueta enzimática, el complejo etiquetado reacciona con un sustrato para la etiqueta que da una reacción cuantificable como el desarrollo de color. Si la etiqueta es una etiqueta radiactiva, se cuantifica la etiqueta utilizando los medios apropiados, tales como un contador de centelleo. Si la etiqueta es una etiqueta fluorescente, la etiqueta se cuantifica al estimular la etiqueta con una luz de un color (que se conoce como la "longitud de onda de excitación") y la detección de otro color (que se conoce como la "longitud de onda de la emisión") que se emite por la etiqueta en respuesta a la estimulación. Si la etiqueta es una etiqueta quimioluminiscente, la etiqueta se cuantifica mediante la detección de la luz emitida ya sea visualmente o mediante luminómetros, película de rayos x, películas fotográficas de alta velocidad, una cámara CCD, etc. Una vez que se ha cuantificado la cantidad de etiqueta en el complejo, la concentración de analito o un fragmento del mismo en la muestra de prueba se determinan por los medios adecuados, como por el uso de una curva estándar que se ha generado mediante diluciones en serie de analito o un fragmento del mismo de concentración conocida. Diferente al uso de diluciones en serie de analito o un fragmento del mismo, la curva estándar puede generarse gravimétricamente, por espectroscopia de masa y por otras técnicas conocidas en la técnica.

En un ensayo de micropartículas quimioluminiscentes empleando el analizador ARCHITECT®, el pH de diluyente de conjugado puede ser

aproximadamente 6.0 +/- 0.2, el regulador de pH de la capa de micropartículas puede mantenerse en aproximadamente la temperatura ambiente (es decir, de aproximadamente 17 a aproximadamente 27 ðC), el pH del regulador de pH de la capa de micropartículas puede ser aproximadamente 6.5 +/- 0.2 y el pH del diluyente de micropartículas puede ser aproximadamente 7.8 +/- 0.2. Sólidos son preferentemente menos de aproximadamente 0.2%, como menos de aproximadamente 0.15%, menos de aproximadamente 0.14%, menos de aproximadamente 0.13%, menos de aproximadamente 0.12%, o menos de aproximadamente 0.11%, tal como aproximadamente 0.10%.

FPIAs se basan en principios de inmunoensayo de unión competitiva. Un compuesto fluorescentemente etiquetado, cuando se excita por una luz polarizada linealmente, emitirá fluorescencia que tiene un grado de polarización inversamente proporcional a su velocidad de rotación. Cuando un complejo de anticuerpo-trazador fluorescentemente etiquetado es excitado por una luz polarizada linealmente, la luz emitida sigue siendo altamente polarizada porque el fluoróforo está restringido de la rotación entre la luz temporal es absorbida y la luz temporal es emitida. Cuando un compuesto trazador “libre” (es decir, un compuesto que no está ligado a un anticuerpo) es excitado por la luz linealmente polarizada, su rotación es mucho más rápida que el correspondiente conjugado trazador-anticuerpo (o proteína de unión de trazador y/o proteína de unión de trazador de acuerdo con la presente descripción) producido en un inmunoensayo de unión competitiva. FPIAs son ventajosos sobre RIAs, ya que no hay sustancias radiactivas que requieran de un manejo especial y eliminación. Además, FPIAs son ensayos homogéneos que se pueden realizar fácilmente y rápidamente.

En vista de lo anterior, se proporciona un método para determinar la presencia, cantidad o concentración de analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba. El método comprende el ensayo de la muestra de prueba para un analito (o un fragmento del mismo) con un ensayo (i) empleando (i') al menos uno de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que se puede unir a un analito, una variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que se puede enlazar a un analito, una proteína

de unión como se describe aquí y una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo) que puede unirse a un analito, y (ii') al menos una etiqueta detectable y (ii) que comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de analito (o un fragmento del mismo) en la muestra de prueba a una señal generada como una indicación directa o indirecta de la presencia, cantidad o concentración de analito (o un fragmento del mismo) en un control o un calibrador. Opcionalmente, el calibrador es parte de una serie de calibradores, en donde cada uno de los calibradores difiere de los otros calibradores por la concentración del analito.

El método puede incluir (i) el contacto de la muestra de prueba con al menos un primera pareja de unión específica para el analito (o un fragmento del mismo) que comprende un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que puede unirse a un analito, una variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, una proteína de unión como se describe aquí, o una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo) que se puede unir a un analito para formar un complejo primera pareja de unión específica/analito (o fragmento del mismo), (ii) contactar el complejo primera pareja de unión específica/analito (o fragmento del mismo) con al menos una segunda pareja de unión específica para analito (o fragmento del mismo) que comprende un anticuerpo anti-analito etiquetado de manera detectable, un fragmento etiquetado de manera detectable de un anticuerpo anti-analito que se puede unir al analito, una variante etiquetada de manera detectable de un anticuerpo anti-analito que se puede unir al analito, un fragmento etiquetado de manera detectable de una variante de un anticuerpo anti-analito que se puede unir al analito, una proteína de unión etiquetada de manera detectable como se describe aquí que se puede unir a un analito, o una proteína de unión de DVD etiquetada de manera detectable (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo) con el fin de formar un complejo primera pareja específica de unión/analito (o fragmento del mismo)/segunda pareja de unión específica, y (iii) determinar la presencia,

cantidad o concentración de analito en la muestra de prueba mediante la detección o medición de la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo primera pareja de unión específica/analito (o fragmento del mismo)/segunda pareja de unión específica formado en (ii). Un método en el que al menos una primera pareja de unión específica de analito (o un fragmento del mismo) y/o al menos una segunda pareja de unión específica para el analito (o un fragmento del mismo) es una proteína de unión como se describe aquí o una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo) como se describe aquí puede ser preferido.

Como alternativa, el método puede constar poner en contacto la muestra de prueba con al menos una primera pareja de unión específica para analito (o un fragmento del mismo) que comprende un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo que se puede unir a un analito, una variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, un fragmento de una variante de un anticuerpo que se puede unir a un analito, una proteína de unión como se describe aquí y una proteína de unión de DVD (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo) y simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, poner en contacto la muestra de prueba con al menos una segunda pareja de unión específica, que puede competir con el analito (o un fragmento del mismo) para la unión a la primera pareja de unión específica al menos una y que comprende un analito etiquetado de manera detectable, un fragmento etiquetado de manera detectable de analito que se puede unir con la primera pareja de unión específica, una variante etiquetada de manera detectable del analito que se puede unir con la primera pareja de unión específica, o un fragmento etiquetado de manera detectable de una variante del analito que se puede unir con la primera pareja de unión específica. Cualquier analito (o un fragmento del mismo) presente en la muestra de prueba y al menos una segunda pareja de unión específica compiten entre sí para formar un complejo de primera pareja de unión específica/analito (o fragmento del mismo) y un complejo de primera pareja de unión específica/segunda pareja de unión específica, respectivamente. El método comprende adicionalmente la determinación de la presencia, cantidad o

concentración de analito en la muestra de prueba por la detección o medición de la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de primera pareja de unión específica/segunda pareja de unión específica formado en (ii), en donde la señal generada por la etiqueta detectable en el complejo de primera pareja de unión específica/segunda pareja de unión específica es inversamente proporcional a la cantidad o concentración del analito en la muestra de prueba.

Los métodos anteriores pueden comprender además diagnosticar, pronosticar o evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico de un paciente del cual se obtiene la muestra de prueba. Si el método además comprende evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente del cual se obtiene la muestra de prueba, el método opcionalmente comprende además modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia. El método puede ser adaptado para su uso en un sistema automatizado o sistema semi-automatizado.

Con respecto a los métodos de ensayo (y por consiguiente del kit), es posible emplear anticuerpos anti-analito comercialmente disponible o métodos para la producción de anti-analito como se describe en la literatura. Suministros comerciales de varios anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA), and R&D Systems (RDS; Minneapolis, MN).

Por lo general, un nivel predeterminado puede ser empleado como punto de referencia contra el cual evaluar los resultados obtenidos en el análisis de una muestra de prueba para analito o su fragmento, por ejemplo, para detectar la enfermedad o riesgo de enfermedad. Generalmente, al hacer tal comparación, el nivel predeterminado se obtiene mediante la ejecución de un ensayo particular de un número suficiente de veces y bajo condiciones apropiadas tal que un enlace o asociación de presencia de analito, cantidad o concentración con una etapa particular o punto final de una enfermedad, trastorno o condición o con indicios clínicos particulares se puede hacer. Normalmente, el nivel predeterminado es obtenido con ensayos de sujetos de referencia (o poblaciones de sujetos). El analito medido puede incluir sus fragmentos, sus productos de degradación, y/o

sus productos de división enzimática.

En particular, con respecto a un nivel predeterminado como se emplea para monitorear la progresión de enfermedad y/o tratamiento, la cantidad o concentración de analito o su fragmento puede ser "no cambiado" "favorable" (o "favorablemente alterado"), o "desfavorable" (o "desfavorablemente alterado"). "Elevada" o "incrementada" se refiere a una cantidad o una concentración en una muestra de prueba que es superior a un nivel o intervalo normal o típico (por ejemplo, el nivel predeterminado), o es superior a otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra de línea de base o temprana). El término "disminuida" o "reducida" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra de prueba que es inferior a un nivel o intervalo normal o típico (por ejemplo, nivel predeterminado), o es inferior a otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra de línea de base o temprana). El término "alterada" se refiere a una cantidad o concentración en una muestra que está alterada (aumentada o disminuida) de un nivel o intervalo normal o típico (por ejemplo, el nivel predeterminado) u otro nivel o intervalo de referencia (por ejemplo, muestra de línea de base o temprana).

El nivel o intervalo típico o normal para analito se define de acuerdo con la práctica estándar. Debido a que los niveles de analito en algunos casos serán muy bajos, un nivel alterado así llamado o alteración puede considerarse que se han producido cuando existe cualquier cambio neto en comparación con el nivel o intervalo típico o normal, o nivel o intervalo de referencia, que no puede explicarse por error experimental o variación de muestra. Así, el nivel medido en una muestra particular será comparado con el nivel o intervalo de niveles determinados en muestras similares de un sujeto normal así llamado. En este contexto, un "sujeto normal" es un individuo con enfermedad no detectable, por ejemplo, y un paciente “normal” (a veces denominado "control") o población es/son uno(s) que no exhiben enfermedad detectable, respectivamente, por ejemplo. Además, dado que el analito rutinariamente no se encuentra a un alto nivel en la mayoría de la población humana, un "sujeto normal" puede ser considerado un individuo sin cantidad o concentración elevada o incrementada sustancial

detectable de analito, y un paciente “normal” (a veces denominado "control") o población es/son uno(s) que no exhiben cantidad o concentración elevada o incrementada detectable sustancial de analito. Un "sujeto aparentemente normal" es uno en que el analito aún no ha sido o está siendo evaluado actualmente. El nivel de un analito es "elevado" cuando el analito es normalmente indetectable (por ejemplo, el nivel normal es cero, o dentro de un intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 percentiles de poblaciones normales), pero se detecta en una muestra de prueba, así como cuando el analito está presente en la muestra de prueba en un nivel superior al normal. Así, inter alia, la descripción proporciona un método de clasificación para un sujeto que tiene, o está en riesgo de tener, una enfermedad, trastorno o condición particular. El método de ensayo también puede involucrar el ensayo de otros marcadores y lo similar.

En consecuencia, los métodos descritos en este documento también pueden utilizarse para determinar si o no un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición determinada. Específicamente, dicho método puede comprender los pasos de:

(a) determinar la concentración o cantidad en una muestra de prueba de un sujeto de analito (o un fragmento del mismo) (por ejemplo, utilizando los métodos descritos aquí, o métodos conocidos en la técnica); y

(b) comparar la concentración o cantidad de analito (o un fragmento del mismo) determinado en el paso (a) con un nivel predeterminado, en donde, si la concentración o cantidad de analito determinado en el paso (a) es favorable con respecto a un nivel predeterminado, después el sujeto está determinado a no tener o estar en riesgo de una enfermedad, trastorno o condición determinada. Sin embargo, si la concentración o cantidad de analito determinado en el paso (a) es desfavorable con respecto al nivel predeterminado, después el sujeto está determinado a tener o estar en riesgo de una enfermedad, trastorno o condición determinada.

Adicionalmente, aquí se proporciona el método para monitorear la progresión de la enfermedad en un sujeto. Óptimamente el método que comprende los pasos de:

(a) determinar la concentración o cantidad en una muestra de prueba de un sujeto de analito;

(b) determinar la concentración o cantidad en una muestra de prueba tardía del sujeto de analito; y

(c) comparar la concentración o cantidad de analito como se determina en el paso (b) con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), en donde si la concentración o cantidad determinada en el paso (b) no es cambiada o es desfavorable en comparación con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), entonces la enfermedad en el sujeto se determina que ha continuado, progresado o empeorado. En comparación, si la concentración o cantidad de analito como se determina en el paso (b) es favorable en comparación con la concentración o cantidad de analito como se determina en el paso (a), entonces la enfermedad en el sujeto se determina que ha sido interrumpida, retrocedida o mejorada.

Opcionalmente, el método además comprende comparar la concentración o cantidad de analito como se determina en el paso (b), por ejemplo, con un nivel predeterminado. Además, opcionalmente el método comprende tratar el sujeto con una o más composiciones farmacéuticas por un período de tiempo si la comparación muestra que la concentración o cantidad de analito como se determina en el paso (b), por ejemplo, es desfavorablemente alterada con respecto al nivel predeterminado.

Aún adicionalmente, los métodos pueden utilizarse para monitorear el tratamiento en un sujeto que recibe tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas. Específicamente, dichos métodos implican proporcionar una primera muestra de prueba de un sujeto antes de que el sujeto haya sido administrado con una o más composiciones farmacéuticas. Después, se determina la concentración o cantidad en una primera muestra de prueba de un sujeto de analito (por ejemplo, utilizando los métodos descritos aquí o como es conocido en la técnica). Después se determina la concentración o cantidad de analito, opcionalmente la concentración o cantidad de analito es entonces comparada con un nivel predeterminado. Si la concentración o cantidad de analito como se

determina en la primera muestra de prueba es inferior al nivel predeterminado, entonces el sujeto no se trata con una o más composiciones farmacéuticas. Sin embargo, si la concentración o cantidad de analito como se determina en la primera muestra de prueba es mayor que el nivel predeterminado, entonces el sujeto es tratado con una o más composiciones farmacéuticas por un período de tiempo. El período de tiempo que el sujeto es tratado con una o más composiciones farmacéuticas puede determinarse por una persona con experiencia en la técnica (por ejemplo, el período de tiempo puede ser de aproximadamente siete (7) días a aproximadamente dos años, preferiblemente de aproximadamente catorce (14) días a aproximadamente un (1) año).

Durante el curso del tratamiento con una o más composiciones farmacéuticas, segunda y posteriores muestras de prueba entonces se obtienen del sujeto. El número de muestras de prueba y el tiempo en el cual las muestras de prueba se obtienen del sujeto no es crítico. Por ejemplo, una segunda muestra de prueba se puede obtener de siete (7) días después de que el sujeto es primero administrado por una o más composiciones farmacéuticas, una tercera muestra de puede obtenerse dos (2) semanas después de que el sujeto es primero administrado con una o más composiciones farmacéuticas, una cuarta muestra de prueba puede obtenerse tres (3) semanas después de que el sujeto es primero administrado con una o más composiciones farmacéuticas, una quinta muestra de prueba puede obtenerse cuatro (4) semanas después de que el sujeto es primero administrado con una o más composiciones farmacéuticas, etc.

Después de que cada segunda o posterior muestra de prueba se obtiene del sujeto, la concentración o cantidad de analito se determina en la segunda o posterior muestra de prueba está determinada (por ejemplo, utilizando los métodos descritos aquí o como son conocidos en la técnica). La concentración o cantidad de analito como se determina en cada una de la segunda y posterior muestras de prueba entonces se compara con la concentración o cantidad de analito como se determina en la primera muestra de prueba (por ejemplo, la muestra de prueba que opcionalmente originalmente se compara con el nivel predeterminado). Si la concentración o cantidad de analito determinada en el paso

(c) es favorable en comparación con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), entonces la enfermedad en el sujeto es determinada por haber sido descontinuada, retrocedida o mejorada, y el sujeto puede continuar siendo administrada a uno o composiciones farmacéuticas del paso (b). Sin embargo, si la concentración o cantidad determinada en el paso (c) no se cambia o es desfavorable en comparación con la concentración o cantidad de analito determinada en el paso (a), entonces la enfermedad en el sujeto es determinada por haber sido continuada, avanzada o empeorada y el sujeto se puede tratar con una mayor concentración de una o más composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en el paso (b) o el sujeto puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas que son diferentes de una o mas composiciones farmacéuticas administradas al sujeto en el paso (b). Específicamente, el sujeto puede tratarse con una o más composiciones farmacéuticas que son diferentes de una o más composiciones farmacéuticas que el sujeto ha recibido previamente para disminuir o bajar el nivel de analito del sujeto.

En general, para los ensayos en que pruebas repetidas pueden hacerse (por ejemplo, monitoreo de progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento), se obtiene una segunda o posterior muestra de prueba en un periodo de tiempo después de que la primera muestra de prueba se ha obtenido del sujeto. Específicamente, puede obtenerse una segunda muestra de prueba del sujeto minutos, horas, días, semanas o años después de que la primera muestra de prueba se ha obtenido del sujeto. Por ejemplo, la segunda muestra de prueba puede obtenerse del sujeto en un periodo de tiempo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas,

aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3.0 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4.0, aproximadamente 4.5 años, aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.5 años, aproximadamente 6.0 años, aproximadamente 6.5 años, aproximadamente 7.0 años, aproximadamente 7.5 años, aproximadamente 8.0 años, aproximadamente 8.5 años, aproximadamente 9.0, aproximadamente 9.5

años o aproximadamente 10.0 años después de la primera muestra de prueba del sujeto se obtiene.

Cuando se utiliza para monitorear la progresión de la enfermedad, el ensayo anterior puede utilizarse para monitorear la progresión de la enfermedad en sujetos que sufren de condiciones agudas. Condiciones agudas, también conocidas como condiciones de cuidados críticos, se refieren a enfermedades agudas, mortales u otras condiciones médicas críticas que involucran, por ejemplo, el sistema cardiovascular o el sistema excretor. Normalmente, las condiciones de cuidados críticos se refieren aquellas condiciones que requieren la intervención médica aguda en un establecimiento basado en el hospital (incluyendo, pero no limitado a, la sala de emergencias, unidad de cuidados intensivos, centro de trauma u otro establecimiento de atención emergente) o administración por un paramédico u otro personal médico basado en el campo. Para condiciones de cuidados críticos, monitoreo de repetición generalmente se realiza dentro de un marco de tiempo más corto, principalmente, minutos, horas o días (por ejemplo, aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días o aproximadamente 7 días), y el ensayo inicial asimismo generalmente se realiza en un plazo más corto, por ejemplo, sobre los minutos, horas o días del comienzo de la enfermedad o condición.

Los ensayos también pueden utilizarse para monitorear la progresión de la enfermedad en sujetos que sufren de condiciones no agudas o crónicas. Cuidado no crítico o, las condiciones no agudas, se refiere a condiciones distintas de enfermedad aguda, que amenazan la vida u otras condiciones médicas críticas que implican, por ejemplo, el sistema cardiovascular y/o el sistema excretor. Normalmente, las condiciones no agudas incluyen aquellas de duración a largo plazo o crónica. Para condiciones no agudas, monitoreo de repetición generalmente se realiza con un plazo de tiempo más largo, por ejemplo, horas, días, semanas, meses o años (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas,

aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas, aproximadamente 50 semanas, aproximadamente 51 semanas, aproximadamente 52 semanas, aproximadamente 1.5 años, aproximadamente 2 años, aproximadamente 2.5 años, aproximadamente 3.0 años, aproximadamente 3.5 años, aproximadamente 4.0, aproximadamente 4.5 años, aproximadamente 5.0, aproximadamente 5.5 años, aproximadamente 6.0 años, aproximadamente 6.5 años, aproximadamente 7.0 años, aproximadamente 7.5 años, aproximadamente 8.0 años, aproximadamente 8.5 años, aproximadamente 9.0, aproximadamente 9.5 años o aproximadamente 10.0 años), y el ensayo inicial asimismo generalmente se realiza dentro de un período de tiempo más largo, por ejemplo, aproximadamente horas, días, meses o años del comienzo de la enfermedad o condición.

Además, los ensayos anteriores pueden realizarse utilizando una primera muestra de prueba obtenida de un sujeto donde la primera muestra es obtenida de una fuente, tal como orina, suero o plasma. Opcionalmente, los ensayos anteriores entonces se pueden repetir usando una segunda muestra de prueba obtenida del sujeto donde se obtiene la segunda muestra de prueba de otra fuente. Por ejemplo, si se obtiene la primera muestra de prueba de orina, puede obtenerse la segunda muestra de prueba de suero o plasma. Pueden compararse los resultados obtenidos de los ensayos usando la primera muestra de prueba y la segunda muestra de prueba. La comparación puede utilizarse para evaluar el estado de una enfermedad o condición en el sujeto.

Además, la presente descripción también se refiere a métodos para determinar si un sujeto predispuesto a o sufre de una enfermedad, trastorno o condición determinada se beneficiará de tratamiento. En particular, la descripción se refiere a métodos y productos de diagnóstico de compañero de analito. Por

tanto, el método de "monitoreo del tratamiento de la enfermedad en un sujeto" como se describe aquí óptimamente también puede incluir adicionalmente seleccionar o identificar candidatos para la terapia.

Así, en modalidades particulares, la descripción también proporciona un método para determinar si un sujeto tiene, o corre el riesgo de una determinada enfermedad, trastorno o condición es un candidato para la terapia. En general, el sujeto es uno que ha experimentado algún síntoma de una determinada enfermedad, trastorno o condición o que actualmente ha sido diagnosticado como que tiene, o está en riesgo de, una determinada enfermedad, trastorno y/o condición y que demuestra una concentración o cantidad desfavorable de analito o un fragmento del mismo, tal como se describe en este documento.

El método comprende opcionalmente un ensayo tal como se describe aquí, donde el analito es evaluado antes y después del tratamiento de un sujeto con una o más composiciones farmacéuticas (por ejemplo, particularmente con un farmacéutico relacionado con un mecanismo de acción que involucra el analito), con terapia inmunosupresora, o por la terapia de immunoabsorción, o donde el analito se evalúa siguiendo dicho tratamiento y la concentración o la cantidad de analito se compara con un nivel predeterminado. Una concentración desfavorable de la cantidad de analito observada después del tratamiento confirma que el sujeto no se beneficiará de recibir tratamiento adicional o continuo, mientras que una concentración o cantidad favorable de analito observada después del tratamiento confirma que el sujeto se beneficiará de recibir tratamiento adicional o continuo. Esta confirmación ayuda en la gestión de los estudios clínicos y provisión de cuidado del paciente mejorado.

Esto es sin decir que, mientras ciertas modalidades aquí son ventajosas cuando se emplean para evaluar una determinada enfermedad, trastorno o condición como se describe aquí, los kits y ensayos pueden ser empleados para evaluar el analito en otras enfermedades, trastornos y condiciones. El método de ensayo también puede implicar el análisis de otros marcadores y lo similar.

El método de ensayo también puede utilizarse para identificar un

compuesto que mejora una determinada enfermedad, trastorno o condición. Por ejemplo, una célula que expresa el analito puede contactarse con un compuesto candidato. El nivel de expresión de analito en la célula que entra en contacto con el compuesto puede compararse al de una célula de control que usa el método de ensayo descrito aquí.

VI) Kit

Un kit para el análisis de una muestra de prueba para la presencia, cantidad o concentración de un analito (o un fragmento del mismo) en una muestra de prueba también se proporciona. El kit comprende al menos un componente de análisis de la muestra de prueba para el analito (o un fragmento del mismo) e instrucciones para ensayo de la muestra de prueba para el analito (o un fragmento del mismo). Al menos un componente para análisis de la muestra de prueba para el analito (o un fragmento del mismo) puede incluir una composición que comprende una proteína de unión como se describe aquí y/o una proteína de unión de DVD anti-analito (o un fragmento, una variante o un fragmento de su variante), que es opcionalmente inmovilizado sobre una fase sólida.

El kit puede comprender al menos un componente de análisis de la muestra de prueba para un analito por inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes e instrucciones para ensayo de la muestra de prueba para un analito por inmunoensayo, por ejemplo, inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes. Por ejemplo, el kit puede comprender de al menos una pareja de unión específica para un analito, tal como un anticuerpo monoclonal/policlonal, anti-analito (o un fragmento del mismo que puede enlazar con el analito, una variante del mismo que puede enlazar con el analito o un fragmento de una variante que puede enlazar con el analito), una proteína de unión como se describe aquí, o una proteína de unión de DVD anti-analito (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo), cualquiera de los cuales puede etiquetarse detectablemente. Alternativamente o adicionalmente, el kit puede comprender de analito etiquetado detectablemente (o un fragmento del mismo que puede enlazar a un anticuerpo monoclonal/policlonal, anti-analito, una proteína de unión como se describe aquí, o una proteína de unión de DVD anti-

analito (o un fragmento, una variante, o un fragmento de una variante del mismo)), que puede competir con cualquier analito en una muestra de prueba para la unión a un anticuerpo monoclonal/policlonal, anti-analito (o un fragmento del mismo que puede enlazar con el analito, una variante del mismo que puede enlazar con el analito, o un fragmento de una variante que puede enlazar con el analito), una proteína de unión como se describe aquí, o una proteína de unión de DVD anti-analito (o un fragmento, una variante o un fragmento de una variante del mismo), cualquiera de los cuales puede ser inmovilizado en un soporte sólido. El kit puede comprender un calibrador o control, por ejemplo, analito aislado o purificado. El kit puede comprender al menos un contenedor (por ejemplo, tubo, placas de microtitulación o tiras, que pueden ser ya recubiertas con una primera pareja de unión específica, por ejemplo) para conducir el ensayo, y/o un regulador de pH, tal como un regulador de pH de ensayo o un regulador de pH de lavado, uno de los cuales se puede proporcionar como una solución concentrada, una solución de sustrato para la etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta enzimática), o una solución de paro. Preferentemente, el kit comprende todos los componentes, es decir, reactivos, estándares, reguladores de pH, diluyentes, etc., que se utilizan para realizar el ensayo. Las instrucciones pueden ser en forma de papel o en formato legible por computadora, tal como un disco, CD, DVD o lo similar.

Más específicamente, se proporciona un kit para análisis de una muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo). El kit comprende al menos un componente de análisis de la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo) e instrucciones para el análisis de la muestra de prueba para un antígeno (o un fragmento del mismo), en donde al menos un componente incluye al menos una composición que comprende una proteína de unión, tal como una proteína de unión a DVD, descrita aquí.

Cualquiera de los anticuerpos, tal como un anticuerpo anti-analito, cualquier proteína de unión como se describe aquí, cualquiera de las proteínas de unión de DVD anti-analito, o trazadores pueden incorporar una etiqueta detectable como se describe aquí, tal como un fluoróforo, un radical radiactivo, una enzima, una etiqueta de biotina/avidina, un cromóforo, una etiqueta quimioluminiscente o lo

similar, o el kit puede incluir reactivos para realizar etiquetado detectable. Los anticuerpos, calibradores y/o controles pueden ser proporcionados en contenedores separados o pre-dispensados en un formato de ensayo apropiado, por ejemplo, en placas de microtitulación.

Opcionalmente, el kit incluye componentes de control de calidad (por ejemplo, paneles de sensibilidad, calibradores y controles positivos). Preparación de los reactivos de control de calidad es bien conocida en la técnica y se describe en hojas de inserto para una variedad de productos de inmunodiagnóstico. Miembros del panel de sensibilidad opcionalmente se utilizan para establecer las características de rendimiento de ensayo, y además opcionalmente son indicadores útiles de la integridad de los reactivos del kit de inmunoensayo, y la normalización de ensayos.

El kit opcionalmente también puede incluir otros reactivos necesarios para conducir un ensayo de diagnóstico o facilitar las evaluaciones de control de calidad, tal como reguladores de pH, sales, enzimas, cofactores de enzima, sustratos de enzima, los reactivos de detección y similares. Otros componentes, tal como reguladores de pH y soluciones para el aislamiento y/o tratamiento de una muestra de prueba (por ejemplo, reactivos de pre-tratamiento), también se pueden incluir en el kit. El kit adicionalmente puede incluir uno o más de otros controles. Uno o más de los componentes del kit pueden ser liofilizados, en cuyo caso el kit puede comprender además los reactivos adecuados para la reconstitución de los componentes liofilizados.

Los diversos componentes del kit opcionalmente se proporcionan en contenedores adecuados según sea necesario, por ejemplo, una placa de microtitulación. El kit además puede incluir contenedores para mantener o almacenar una muestra (por ejemplo, un contenedor o un cartucho para una muestra de orina). En su caso, el kit opcionalmente también puede contener los recipientes de reacción, recipientes de mezclado y otros componentes que facilitan la preparación de reactivos o la muestra de prueba. El kit también puede incluir uno o más instrumentos para ayudar a la obtención de una muestra de prueba, tal como una jeringa, pipeta, fórceps, cuchara de medición, o lo similar.

Si la etiqueta detectable es al menos un compuesto de acridina, el kit puede comprender al menos una acridina-9-carboxamida, al menos un éster arílico de acridina-9-carboxilato o cualquier combinación de los mismos. Si la etiqueta detectable es al menos un compuesto de acridina, el kit también puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno, tal como un regulador de pH, una solución y/o al menos una solución básica. Si se desea, el kit puede contener una fase sólida, tal como una partícula magnética, perla, tubo de ensayo, placa de microtitulación, cubeta, membrana, molécula de andamios, película, papel de filtro, disco o chip.

A. Adaptación del kit y método

El kit (o sus componentes), así como el método para determinar la presencia, cantidad o concentración de un analito en una muestra de prueba, tal como un inmunoensayo como se describe aquí, puede ser adaptado para su uso en una variedad de sistemas automatizados y semi-automatizados (incluyendo aquellos en donde la fase sólida comprende una micropartícula), como se describe, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Nos. 5,089,424 y 5,006,309 y vendida comercialmente, por ejemplo, por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) como ARCHITECT®.

Algunas de las diferencias entre un sistema automatizado o semi-automatizado en comparación con un sistema no automatizado (por ejemplo, ELISA) incluyen el sustrato al cual la primera pareja de unión específica (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal/policlonal anti-analito, (o su fragmento, una variante del mismo o un fragmento de una variante del mismo), una proteína de unión como se describe aquí, o una proteína de unión de DVD anti-analito (o su fragmento, su variante, o su fragmento de una variante) se une; ya sea a manera, de formación sándwich y reactividad de analito puede ser impactado) y la longitud y el tiempo de la captura, detección y/o cualquiera de los pasos de lavado opcionales. Mientras que un formato no automatizados, tal como un ELISA, puede requerir un tiempo de incubación relativamente largo con reactivo de captura y muestra (por ejemplo, aproximadamente 2 horas), un formato automatizado o

semi-automatizado (por ejemplo, ARCHITECT®, Abbott Laboratories) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, aproximadamente 18 minutos para ARCHITECT ®). Asimismo, considerando que un formato no automatizado, tal como un ELISA, puede incubar un anticuerpo de detección, tal como el reactivo conjugado, por un período de incubación relativamente largo (por ejemplo, unas 2 horas), un formato automatizado o semi-automatizado (por ejemplo, ARCHITECT®) puede tener un tiempo de incubación relativamente más corto (por ejemplo, aproximadamente 4 minutos para el ARCHITECT®).

Otras plataformas disponibles de Abbott Laboratories incluyen, pero no se limitan a, AxSYM®, IMx® (véase, por ejemplo, Patente de E.U.A. Nos 5,294,404, PRISM®, EIA (perla) y Quantum™ II, así como otras plataformas. Además, los ensayos, kits y componentes del kit pueden ser empleados en otros formatos, por ejemplo, en sistemas de ensayos electroquímicos u otros de punto de atención portátiles. La presente descripción es, por ejemplo, aplicable a sistema de inmunoensayo electroquímico comercial Abbott Point of Care (i-STAT®, Abbott Laboratories) que realiza inmunoensayos de sándwich. Se describen inmunosensores y sus métodos de fabricación y operación de dispositivos de prueba de un solo uso, por ejemplo en, Patente de E.U.A. Nos. 5,063,081, 7,419,821; y 7,682,833; Publicación de E.U.A. Nos. 20040018577 y 20060160164.

Es más evidente decir que los métodos y kits como se describe en este documento necesariamente incluyen otros reactivos y métodos para la realización del inmunoensayo. Por ejemplo, se incluyen varios reguladores de pH tal como son conocidos en la técnica y/o que pueden ser fácilmente preparados u optimizados para emplearse, por ejemplo, para el lavado, como un diluyente conjugado, diluyente de micropartículas, y/o como un diluyente calibrador. Un diluyente conjugado ejemplar es ARCHITECT® diluyente conjugado empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y que contiene ácido 2-(N-morfolino)etanosulfonico (MES), una sal, un bloqueador de proteína, un agente antimicrobiano, y un detergente. Un diluyente de calibrador ejemplar es diluyente calibrador humano ARCHITECT® empleado en ciertos kits (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), que comprende un regulador de pH que contiene el MES, otra sal,

un bloqueador de proteína y un agente antimicrobiano. Adicionalmente, como se describe en Solicitud de patente de E.U.A. Nos. 61/142,048 presentada el 31 de diciembre de 2008, generación de señal mejorada puede obtenerse, por ejemplo, en un formato de cartucho de I-Stat, utilizando una secuencia de ácido nucleico enlazada al anticuerpo de señal como un amplificador de señal.

Será aparente para aquellos de experiencia en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos descritos aquí son obvios y pueden realizarse usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de las modalidades descritas aquí. Ahora se describen ciertas encarnaciones en detalle, las mismas serán más claramente entendidas para referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen para fines de ilustración solamente y no están destinadas a ser limitantes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Proteínas de unión parental de TNF-α mejoradas

EJEMPLO 1.1

Identificación de proteínas de unión completamente humanas a TNF por sistemas de despliegue in vitro

1.1.1 Selecciones de anticuerpo

Anticuerpos monoclonales de TNF anti-humanos completamente humanos fueron aislados por tecnologías de visualización in vitro de genotecas de anticuerpo humano por su capacidad de enlazar proteínas de TNF humanas recombinantes. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas variables (VH) y ligeras variables (VL) se determina a partir de la secuenciación del ADN y enumeradas en el cuadro 1B en la sección A) I) A) anteriormente.

1.1.2: Maduración de afinidad de la proteína de unión de TNF

humana completamente humana AE11-5

La proteína de unión humana AE11-5 a TNF humano fue madurado de afinidad por la tecnología de despliegue in vitro. Una genoteca de cadena ligera fue construida para contener la mutagénesis limitada en los siguientes residuos: 28, 31, 32, 51, 55, 91, 92, 93, 95a y 96 (numeración de Kabat). Esta genoteca contiene también retro-mutaciones de línea germinal de marco contenidas D1E, M4L, H11Q, R49K, H76N y Q103K, así como residuos alternados en posición 50(R/K) y 94(S/L) para permitir el lineamiento germinal de marco durante selecciones de genoteca. Dos genotecas de cadena pesada se hicieron para contener la mutagénesis limitada en CDRH1 y CDRH2 en residuos 30, 31, 33, 50, 52 y 55 a 58 (numeración de Kabat) o en CDRH3 en residuos 95 a 100b. La genoteca que contiene diversidades CDRH1 y CDRH2 también tiene retro-mutaciones de línea germinal de marco A18V y L64Q y alternar el residuo en 54(L/F) y 78(V/A). La genoteca de CDRH3 tiene un residuo alternado adicional en 100c(A/F).

Todas las tres genotecas fueron seleccionadas por separado para que poder enlazar a TNF de mono cynomolgus o humano en presencia de la disminución de concentraciones de antígenos de TNF de mono cynomolgus o humano biotinilado. Todas las secuencias de CDR mutadas recuperadas de selecciones de genoteca se recombinan en genotecas adicionales y las genotecas recombinadas fueron sometidas a condiciones de selección más estrictas antes de que se identifiquen anticuerpos individuales.

El siguiente cuadro (cuadro 2) proporciona una lista de secuencias de aminoácidos de VH y VL de la proteína de unión AE11-5 completamente humana que fueron sometidos al protocolo de selección de la maduración de afinidad. Residuos de aminoácidos de CDRs individuales de cada secuencia VH y VL se indican en negrita.

CUADRO 2

Residuos de aminoácidos observados en anticuerpos AE11-5 madurados de afinidad

AE11-5 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 805)

AE11-5VH

```
1234567890123456789012345678901234567890123456789012a345678901
EVQLVQSGAEVKKPGSSAKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGTANYAQ
                  V           NW TTT              WT   FRSPI
                              TY SV                M   TDAST
                              GI P                 L   I NGS
                              AN G                 V     P V
                               F                   N     I H
                               R                         V A
                               L                         K R
                                                         F M
                                                           L
```

```
23456789012345678901abc345678901234567890abc1234567890123
KFLGRVTITADESTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGLYYDPTRADYWGQGTLVTVSS
  Q             A                   SVFFNTSWF
                                    WIVVEFASM
                                    TFP TRKP
                                    ARH IGRA
                                     Q  ADI
                                          Y
                                          V
                                          P
                                          N
                                          G
```

AE11-5 Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 806)

AE11-5VL

```
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
DIVMTQSPDFHSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIRHASQSISGVPSR
E  L      Q               R  RR                KYV   L
                           T  TT                  P   V
                           N  GN                  T   T
                           I  NC                  G   S
                           C  KG                  S   M
                           G  CI                  E   N
                           K  HK                  D   K
                           Y  VM                      F
                           W  PL                      R
                              LY
                               P
                               V
```

```
23456789012345678901234567890123456789012345a67890123456a
FSGSGSGTDFTLTIHSLEAEDAATYYCHQSSSSPPPTFGQGTQVEIK
              N             RRRL LS      K
                            NGI  AR
                            GIC  SL
                            TCG  RT
                            CNN  TA
                            ITT  QQ
                             MK  HH
                                  V
                                  M
```

EJEMPLO 1.2

Maduración de afinidad de una proteína de unión TNF humana humanizada hMAK-195

El anticuerpo TNF antihumano de ratón MAK-195 se humaniza y madura de afinidad para generar un panel de variantes MAK195 humanizado que

tienen reactividad cruzada cino-TNF y afinidad mejorada y cinéticas de unión contra cino-TNF y humano.

Para mejorar la afinidad de hMAK195 a TNF, se identifican residuos CDR hipermutados de otras secuencias de anticuerpo humano en la base de datos IgBLAST que también comparte identidad alta a líneas germinales VH3-53 e IGKV1-39. Los residuos CDR hMAK195 correspondientes después se someten a mutagénesis limitada por PCR con iniciadores que tienen degeneración baja en estas posiciones para crear tres genotecas de anticuerpos en el formato scFv. La primera genoteca contiene mutaciones en residuos 31, 32, 33, 35, 50, 52, 53, 54, 56 y 58 en el CDR1 VH y 2 (numeración de Kabat); la segunda genoteca en residuos 95 a 100, 100a, 101 y 102 en CDR3 VH; y la tercera genoteca en residuos 28, 30, 31, 32, 50, 53, 92, 93, 94 y 95 en la tres CDRs VL. Para aumentar adicionalmente la identidad de hMAK195 para las secuencias de marco de la línea germinal humana, una degeneración binaria en posiciones de VH 60 (D/A), 61 (S/D), 62 (T/S), 63 (L/V) y 65 (S/G) se introducen en la primera genoteca. También, una degeneración binaria en las posiciones de VL 24 (K/R), 33 (V/L), 54 (R/L), 55 (H/Q), 56 (T/S), 91 (H/S) y 96 (F/Y) se introducen en la tercera genoteca.

Estos hMAK195 seleccionados contra una baja concentración de TNF biotinilado para mejor en la tasa encendida, tasa apagada o ambas se llevan a cabo y secuencias de proteínas de anticuerpo de hMAK195 modulada de afinidad se recuperan para la conversión nuevamente a IgG para caracterización adicional. Las tres genotecas son seleccionadas por separado para la capacidad de unir TNF de mono cynomolgus o humano en presencia de la disminución de concentraciones de antígenos de TNF de mono cynomolgus o humano biotinilados. Todas las secuencias de CDR mutadas recuperadas de selecciones de genoteca se recombinan en genotecas adicionales y las genotecas recombinadas se someten a condiciones de selección más estrictas antes de que anticuerpos individuales se identifican.

El siguiente cuadro (cuadro 3) proporciona una lista de secuencias de aminoácidos de VH y VL de MAK-195 humanizado que se someten al Protocolo de selección de la maduración de afinidad. Residuos de aminoácidos de CDRs

individuales de cada secuencia VH y VL se indican en negrita.

CUADRO 3

Residuos de aminoácidos observados en hMAK-195 madurado de afinidad

hMAK195 región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 807)	
hMAK195VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**DYGVN**WVRQAPGKGLEWVS**MIWGDGSTD** NFS T I RAG T A HLN S V GSE F H YS H L SDA A V IR Q R AEV Y S Y K LVG W N S NY G
	YDSTLKSRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWHHGPVAYWGQGTLVTVSS ADSV G HSQQRTLDS QLRPASGVF LCLLVQDGC YRYNWAETN DFPYEKW P NDARS R I TYVTP P H PPDDI A AICA I SG C R
hMAK195 región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 808)	
hMAK195VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQAVSSAVA**WYQQKPGKAPKLLIY**WASTRHT**G R S RRPL S SLQS V TNT R I T G IGG L L A D NCV C K E T CTS Q A F P KIR G R
	VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQHYSTPFT**FGQGTKLEIK SNRSTY FGPR DTML GIIQ HCAA S

Los cuadros 1D y E anteriormente en la sección I) A) proporcionan una lista de anticuerpos MAK-195 humanizados que se convierten en proteínas IgG para caracterización.

Pares de cadenas ligeras y pesadas se preparan como sigue en el cuadro 4:

CUADRO 4

Pares de cadenas pesada y ligera de clones madurados de afinidad hMAK195

Nombre del clon	HC	LC	Nombre de la proteína
A8	hMAK195-**A8**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM11
B5	hMAK195-**B5**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM13
rHC3	hMAK195 **rHC3**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM14
rHC18	hMAK195 **rHC18**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM15
rHC19	hMAK195 **rHC19**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM16
rHC22	hMAK195 **rHC22**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM17
rHC34	hMAK195 **rHC34**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM18
rHC60	hMAK195 **rHC60**	hMAK195 VL.1	hMAK195-AM19
S4-6	hMAK195 **S4-6**	hMAK195 **S4-6**	hMAK195-AM20
S4-12	hMAK195 **S4-12**	hMAK195 **S4-12**	hMAK195-AM21
S4-17	hMAK195 **S4-17**	hMAK195 **S4-17**	hMAK195-AM22
S4-18	hMAK195 **S4-18**	hMAK195 **S4-18**	hMAK195-AM23
S4-19	hMAK195 **S4-19**	hMAK195 **S4-19**	hMAK195-AM24
S4-24	hMAK195 **S4-24**	hMAK195 **S4-24**	hMAK195-AM25
S4-34	hMAK195 **S4-34**	hMAK195 **S4-34**	hMAK195-AM26

EJEMPLO 1.3

Maduración de afinidad de una proteína de unión TNF humana humanizada hMAK-199

El anticuerpo TNF antihumano de ratón MAK-199 es humanizado y madurado de afinidad para generar un panel de variantes de MAK195 humanizado que tiene afinidad y cinéticas de unión mejoradas contra cino TNF y humanos. Varias genotecas se hacen de acuerdo con las siguientes especificaciones:

Tres genotecas HC se hacen después de la retro-mutación V2I primero se introduce y confirma que no impacta la afinidad scFv a TNF.

Genoteca H1 + H2 (DDK):

- Mutagénesis limitada a 7 residuos (T30, N31, N35, T52a, T54, E56, T58)

- Alternar la línea germinal: M34I y F63LH1

Genoteca H1 + H2 (QKQ):

- Mutagénesis limitada a 7 residuos (T30, N31, N35, T52a, T54, E56, T58)

- Alternar la línea germinal: M34I y F63L

- Retro-mutaciones de línea germinal: D61Q, D62K, K64Q, F67V, F69M, L71T

Genoteca H3:

- Mutagénesis limitada en 12 residuos 95-100, 100a-100f

- Alternar la línea germinal: F91Y

Genoteca LC:

- Mutagénesis limitado a 11 residuos 28, 30-32, 50, 53, 91-94, 96

- Alternar la línea germinal: T51A, Y71F, F87Y y T43A/V44P (estos dos co-evolucionan)

Genotecas recombinadas:

Genotecas VH se recombinarán con y sin la genoteca VL después de diversidad de genoteca se reduce después de al menos 3 rondas de selección.

Todas las cuatro genotecas se seleccionan por separado para que poder enlazar TNF de mono cynomolgus o humano en presencia de la disminución de concentraciones de antígenos TNF de mono cynomolgus o humano biotinilado. Todas las secuencias de CDR mutadas recuperadas de selecciones de genoteca se recombinan en genotecas adicionales y las genotecas recombinadas son sometidas a condiciones de selección más estrictas antes que los anticuerpos individuales se identifican.

El siguiente cuadro (cuadro 5) proporciona una lista de secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo hMAK-199 que se someten al protocolo de selección de maduración de afinidad. Residuos de aminoácidos de CDRs individuales de cada secuencia VH y VL se indican en negrita.

CUADRO 5

Residuos de aminoácidos observados en proteínas de unión hMAK-199 maduradas de afinidad

MAK199 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 809)	
MAK199VH .2a	1234567890123456789012345678901234567890123456789012a345678901 **EI**QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**NYGMN**WVRQAPGQGLEWMG**WINTYTGEPTYAD** V ND II N K S Q AH T S V H ST Q Q N RS S R M DQ G L K KK A S A P V N R Q I Q M D D G A E
	2345678901234567890123abc34567890123456789012abcdefg1234567890123 **DFKG**R**F**T**FT****L**DTSTSTAYMEL**S**SLRS**E**DTAVY**F**CAR**KFLTTVVVTDYAMDY**WGQGTTVTVSS GLT V M T Y RLFNPMDASENT K Q NYMKVEAEM SR IRSSAEMN CC VSRARSD H CWL IMG D QP QII I VF GPQ F ND D P V GM N L CA L A H
Mak199 Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 810)	
Mak199Vk .1a	**12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901** DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDISNYLN**WYQQKPGK**TV**KLLIY**YTSRLQS**GVPSR N YQV AP FA L E ESF V N K H AKT G G TT V WH R GD A NR F C
	2345678901234567890123456789012345678901234567890123456a FSGSGSGTD**Y**TLTISSLQPEDFATY**F**C**QQGNTLPPT**FGQGTKLEIK F Y ISW T MQ S IP A AM RR F G V Y A

Secuencias individuales de VH y VL hMAK-199 de clones convertidos se preparan y se muestran anteriormente en cuadros 1F y G en la sección I) A).

CUADRO 6

Clones scFv madurados de afinidad hMAK199 convertidos a IgG de longitud completa

ScFv Nombre del clon	Plásmido HC	Plásmido LC	Nombre (proteína) de IgG de longitud completa
J662M2S3#10	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#10	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#10	hMAK199-AM1
J662M2S3#13	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#13	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#13	hMAK199-AM2
J662M2S3#15	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#15	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#15	hMAK199-AM3
J662M2S3#16	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#16	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#16	hMAK199-AM4
J662M2S3#21	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#21	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#21	hMAK199-AM5
J662M2S3#34	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#34	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#34	hMAK199-AM6
J662M2S3#36	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#36	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#36	hMAK199-AM7
J662M2S3#45	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#45	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#45	hMAK199-AM8
J662M2S3#58	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#58	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#58	hMAK199-AM9
J662M2S3#72	pHybE-hCg1,z,non-a V2 J662M2S3#72	pHybE-hCk V3 J662 M2S3#72	hMAK199-AM10

EJEMPLO 1.4

Determinación de afinidad usando tecnología BIACORE

CUADRO 7

Reactivo para análisis biacore

Antígeno	Designación de vendedor	Vendedor	# Catalogo
TNFα	TNF-α/TNFSF1A humano recombinante	Sistemas R&D	210-TA

Métodos BIACORE:

El ensayo BIACORE (Biacore, Inc. Piscataway, NJ) determina la afinidad de proteínas de unión con mediciones cinéticas de constantes de velocidad de asociación y velocidad de disoción. Unión de proteínas de unión a un antígeno objetivo (por ejemplo, un antígeno objetivo recombinante purificado) está determinada por las mediciones basadas en la resonancia de plasmón de superficie con Biacore® 1000 o instrumento 3000 (Biacore® AB, Uppsala, Suecia) usando ejecutar HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0.005% agente tensoactivo P20) a 25°C. Todos los químicos son obtenidos de Biacore® AB (Uppsala, Suecia) o de otra manera desde una fuente diferente como se describe en el texto. Por ejemplo, aproximadamente 5000 RU de IgG anti-ratón de cabra, (Fcγ), anticuerpo policlonal específico de fragmento (Pierce

Biotechnology Inc, Rockford, Illinois, Estados Unidos) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) se inmoviliza directamente a través de un chip biosensor de grado de investigación CM5 utilizando una kit de acoplamiento de amina estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los procedimientos en 25 μg/ml. Radicales que no reaccionan en la superficie del biosensor están bloqueados con etanolamina. Superficie de dextrano de carboximetil modificado en celda de flujo 2 y 4 se utiliza como una superficie de reacción. Dextrano carboximetil sin modificar sin IgG anti-ratón de cabra en celda de flujo 1 y 3 se utiliza como la superficie de referencia. Para análisis cinético, ecuaciones de tasa derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 se asocian simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las ocho inyecciones (usando análisis de ajuste global) con el uso de software de Biaevaluation 4.0.1. Anticuerpos purificados se diluyen en solución salina regulada de pH con HEPES para captura a través de superficies de reacción específica de IgG anti-ratón de cabra. Anticuerpos a ser capturados como un ligando (25 μg/ml) se inyectan en matrices de reacción a un caudal de 5 μl/minuto. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, k_{asoc} ($M^{-1}s^{-1}$) y k_{disoc} (s^{-1}), se determinan utilizando un caudal continuo de 25 μl/minuto. Constantes de velocidad se derivan haciendo mediciones de unión cinética en concentraciones de antígeno diferentes que van desde 10-200 nM. La constante de disociación de equilibrio (M) de la reacción entre los anticuerpos y los antígenos objetivo entonces se calcula de las constantes de velocidad cinética mediante la siguiente fórmula: $K_D = k_{disoc}/k_{asoci}$. Unión se registra como una función del tiempo y constantes de velocidad cinética se calculan. En este ensayo, en tasas tan rápidas como $10^6 M^{-1}s^{-1}$ y velocidades de disociación tan lentas como $10^{-6}s^{-1}$ se pueden medir.

Las proteínas de unión en el presente documento se espera que tengan propiedades benéficas en este sentido, incluyendo la alta afinidad, lenta velocidad de dosiciación, y alta capacidad de neutralización.

EJEMPLO 1.5

Neutralización de TNF-α humano

Las células L929 se cultivan a una densidad de semi-confluente y se cosechan utilizando tripsina al 0.25% (Gibco #25300). Las células se lavan con PBS, contadas y re-suspendidas en 1E6 células/mL en los medios de ensayo que contienen 4 μg/mL de actinomicina D. Las células se siembran en una placa de 96 pozos (Costar #3599) en un volumen de 100 μL y 5E4 células/pozo. Las proteínas de unión e IgG de control son diluidas a una concentración 4X en medios de ensayo y se realizan diluciones 1:4 seriales. HuTNF-α se diluye a 400 pg/mL en los medios de ensayo. Muestra de proteína de unión (200 μL) se añade a huTNF-α (200 μL) en un esquema de dilución 1:2 y permite incubar durante 0.5 horas a temperatura ambiente.

La solución de TNF-α humano/proteína se añade a las células plateadas en 100 μL para una concentración final de 100 pg/mL de huTNF-α y 150 nM-0.0001 nM de proteína de unión. Las placas se incuban durante 20 horas a 37ºC, 5% de CO_2. Para cuantificar la viabilidad, 100 μL se extraen de los pozos y se agregan 10 μL de reactivo WST-1 (Roche cat # 11644807001). Las placas se incuban en condiciones de ensayo durante 3.5 horas. Las placas se leen en OD 420 600 nm en un lector de placas ELISA Spectromax 190.

Las proteínas de unión aquí se espera que tengan propiedades beneficiosas en este sentido, incluyendo alta afinidad, velocidad de disociación lenta y alta capacidad de neutralización.

EJEMPLO 2

Maduración de afinidad de anticuerpo IL-17 anti-humano humanizado h10F7

El anticuerpo IL-17 anti-humano humanizado fue previamente descrito. Este anticuerpo fue posteriormente madurado de afinidad para mejorar su afinidad total al ser humano, mono de cynomolgus y ratón IL-17. Varias genotecas se hacen de acuerdo con las siguientes especificaciones:

Genoteca H1 + H2:

- Mutagénesis limitada en 7 residuos en 30, 31, 33, 35, 53, 56, 57 y 58.

- Alternar entre la línea germinal humana y secuencias de h10F7 en posiciones 27, 48, 51, 52, 54, 67 y 69.

Genoteca H3:

- Mutagénesis limitada en 95 – 100 y 102.

- Alternar entre la línea germinal humana y secuencias de h10F7 en 93.

Genoteca de LC 1:

- Mutagénesis limitada en 30, 31, 32, 34, 50, 53, 89, 91, 92, 93 y 96.

- Alternar entre la línea germinal humana y secuencia de h10F7 en las posiciones 4, 24, 27, 29, 33, 36, 43, 47, 52 y 55.

Genoteca LC 2: construida con un residuo adicional en posición G28 en CDR1 para aumentar la identidad a los anticuerpos humanos.

- Mutagénesis limitada a 28, 30, 31, 32, 34, 50, 53, 89, 91, 92, 93 y 96.

- Alternar entre la línea germinal humana y secuencia de h10F7 en posiciones 24, 27, 29, 33, 37, 44, 48, 52 y 55.

- Mutación de línea germinal de marco en FR1 (posición 4) a probarse primero como scFv. "M" será usado en lugar de "L" Si la unión no se ve afectada.

Genoteca rHC: recombinar salidas de genotecas H1 + H2 y H3.

Genoteca rHCLC: recombinar salidas de H1 + H2, H3 y genotecas LC1 o LC2. (Usar LC2 en lugar LC1 si unión de salida de LC2 parece ser al menos tan bueno como WT, de lo contrario se recombinan la salida de LC1).

Todas las cuatro genotecas fueron seleccionadas por separado para la capacidad de unir IL-17 de ratón y nomo cynomolgus, humano en la presencia de la disminución de las concentraciones de antígenos biotinilados. Todas las secuencias de CDR mutadas recuperadas de selecciones de genotecas se recombinan en genotecas adicionales y las genotecas recombinadas fueron sometidas a condiciones de selección más estrictas antes de que se identifiquen anticuerpos individuales.

El cuadro 8 proporciona una lista de secuencias de aminoácidos VH de anticuerpo h10F7 que fueron sometidos al protocolo de selección de

maduración de afinidad. Residuos de aminoácidos de CDRs individuales de cada secuencia VH se indican en negrita.

CUADRO 8

Lista de secuencias de aminoácidos de variantes VH h10F7 maduradas de afinidad

Clon	SEQ ID NO:	VH
J417M2S2-12VH	121	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYE IH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTFYNQKFDG** RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-15VH	122	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYE IH**WVRQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG** RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-16VH	123	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYE IH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG** RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-18VH	124	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYE IH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPDSGGTLYNQKFDG** RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-20VH	125	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYE IH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTMYNQKFDG** RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-23VH	126	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYE IH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG** RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-25VH	127	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYE IH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG** RVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-26VH	128	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYE IH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG** RATLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J417M2S2-34VH	129	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYE IH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG** RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**Y YRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J417M2S2-37VH	130	EVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKASGYTFE**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-47VH	131	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-4VH	132	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-50VH	133	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-51VH	134	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFE**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-55VH	135	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-56VH	136	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFHGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-57VH	137	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFA**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-64VH	138	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-65VH	139	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-69VH	140	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFE**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RATITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J417M2S2-72VH	141	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTK**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-73VH	142	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RATITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-75VH	143	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RATITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-76VH	144	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**EYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGSFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-7VH	145	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-84VH	146	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VIDPESGGSLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-85VH	147	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RATITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-86VH	148	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-89VH	149	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGSLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-91VH	150	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S2-95VH	151	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGILYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J417M2S2-96VH	152	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-14VH	153	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-35VH	154	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**EYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-54VH	155	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-63VH	156	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-81VH	157	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RATITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-83VH	158	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGSFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-86VH	159	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RATITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J417M2S3-89VH	160	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTTDK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-1VH	161	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-20VH	162	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKYWSFSGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J420M2S2-21VH	163	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYFGFSGMDF**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-22VH	164	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFDSFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-28VH	165	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYEGFLGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-30VH	166	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-34VH	167	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-39VH	168	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYESFSGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-40VH	169	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWEGFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-41VH	170	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFYGMDF**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-47VH	171	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDGFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-50VH	172	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-51VH	173	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J420M2S2-53VH	174	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDRYWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-56VH	175	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYKWDSFLGMDF**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-57VH	176	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDMWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-58VH	177	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYKWWGFMGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-60VH	178	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYWGFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-64VH	179	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-65VH	180	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYESFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-67VH	181	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWMSFSGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-71VH	182	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFYGFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-72VH	183	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYKWDSFYGMDA**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-79VH	184	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFSGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J420M2S2-80VH	185	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-87VH	186	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWWSFSGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-89VH	187	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFAGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-95VH	188	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRWESFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S2-9VH	189	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYESLNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-12VH	190	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YWKWDSFFGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-21VH	191	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFSGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-25VH	192	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYVGFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-27VH	193	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-29VH	194	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-32VH	195	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YFKWDSFEGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J420M2S3-39VH	196	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWNSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-3VH	197	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-55VH	198	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-57VH	199	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YWKWDSFYGMDS**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-68VH	200	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-70VH	201	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWEGFRGMDL**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-73VH	202	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YEKWDSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-76VH	203	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYKWESFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-77VH	204	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFYSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J420M2S3-94VH	205	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YNKWDSFLGMDY**W GQGTTVTVSS
J425M2S2-29VH	206	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYESFNGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J425M2S2-41VH	207	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GKGTTVTVSS
J427M2S3-88VH	208	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J427M2S3-91VH	209	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-A12VH	210	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDRYWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-A3VH	211	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YWKWDSFFGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B18VH	212	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B19VH	213	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFP**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B23VH	214	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTYYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B2VH	215	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFLGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B38VH	216	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B40VH	217	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)3-B51VH	218	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B52VH	219	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDE**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B5VH	220	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-B62VH	221	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFN**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTYYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C13VH	222	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLSADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C15VH	223	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C17VH	224	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C19VH	225	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C20VH	226	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFA**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C21VH	227	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YEKWDSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C25VH	228	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RITLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)3-C4VH	229	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSLNGMDE**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C5VH	230	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDRYWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C6VH	231	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-C9VH	232	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D11VH	233	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFP**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D12VH	234	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D15VH	235	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFE**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFLGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D18VH	236	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D24VH	237	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D25VH	238	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFA**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D29VH	239	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTTDK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)3-D2VH	240	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D30VH	241	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D36VH	242	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D38VH	243	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D3VH	244	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D6VH	245	EVQLVQSGAEVRKPGSSVKVSCKASGYTFE**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D8VH	246	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWWSFSGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3-D9VH	247	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-A10VH	248	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFA**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-A11VH	249	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFA**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-A12VH	250	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)R4-A1VH	251	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDC**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-A4VH	252	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YWKWDSFYGMDS**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-A5VH	253	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-A6VH	254	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-A9VH	255	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDGFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-B10VH	256	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFLGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-B2VH	257	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWEGFRGMDL**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-B5VH	258	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQRLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-B7VH	259	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDRYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-B9VH	260	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-C11VH	261	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)R4-C12VH	262	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**EYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-C2VH	263	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RATITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYKWDSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-C4VH	264	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-C5VH	265	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-C7VH	266	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTMYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDC**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-C8VH	267	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D10VH	268	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D11VH	269	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGILYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFAGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D2VH	270	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDRWDSFNGMDE**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D3VH	271	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D4VH	272	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YWKWDSFYGMDS**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)R4-D5VH	273	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D6VH	274	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFSGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D8VH	275	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R4-D9VH	276	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTMYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDC**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-E11VH	277	EVQLVQSWAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**EYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-E1VH	278	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDC**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-E2VH	279	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-E3VH	280	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YFKWDSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-E4VH	281	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YWKFDSFYGMDL**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-E6VH	282	EVQLVQSGAEVKKPGSPVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-E7VH	283	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)R5-E9VH	284	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-F11VH	285	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-F2VH	286	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YEKWDSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-F3VH	287	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-F4VH	288	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-F6VH	289	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFAGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-F8VH	290	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-F9VH	291	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-G10VH	292	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYKYWSFLGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-G12VH	293	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFE**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-G1VH	294	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)R5-G2VH	295	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFAGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-G3VH	296	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFQGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-G4VH	297	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-G7VH	298	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-G9VH	299	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDC**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-H11VH	300	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDRWDSFNGMDE**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-H12VH	301	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTLYNQKFDG**RVTITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-H1VH	302	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-H2VH	303	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFN**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VIDPESGGTLYNQKFDG**RATITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-H3VH	304	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFLGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-H4VH	305	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFA**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDC**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S2(H)R5-H8VH	306	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFYGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2(H)R5-H9VH	307	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKFWSFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2-11VH	308	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2-32VH	309	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFE**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2-34VH	310	EVQLVQSGAEVKKPRSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFNGMDY**W GQGTTVTISS
J439M1S2-39VH	311	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2-7VH	312	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S2-9VH	313	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWESFSGMDH**W GQGTTVTVSS
J439M1S3R4-38VH	314	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S3R4-46VH	315	EVQLVQSGAEETKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS

Clon	SEQ ID NO:	VH
J439M1S3R4-4VH	316	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WV RQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**W GQGTTVTVSS
J439M1S3R5-15VH	317	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WV RQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**W GQGTTVTVSS

El cuadro 9 proporciona una lista de secuencias de aminoácidos de las regiones VL de anticuerpos IL-17 humanos completamente madurados de afinidad derivados de h10F7. Residuos de aminoácidos de CDRs individuales de cada secuencia VH se indican en negrita.

CUADRO 9

Lista de secuencias de aminoácidos de variantes VL h10F7 maduradas de afinidad

Clon	SEQ ID NO:	VL
J417M2S2-37Vk	318	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKLWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J417M2S2-46Vk	319	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J417M2S2-72Vk	320	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J417M2S2-96Vk	321	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J417M2S3-12Vk	322	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPFT**FGQGTKLEIK
J417M2S3-3Vk	323	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSVRYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSDLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPFT**FGQGTKLEIK
J417M2S3-83Vk	324	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J417M2S3-86Vk	325	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J420M2S2-32Vk	326	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J420M2S2-91Vk	327	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J420M2S3-32Vk	328	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGIKLEIK
J425M2S2-13Vk	329	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSVSYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSYYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-15Vk	330	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIINYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPPT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S2-17Vk	331	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISPIY**WFQQK PGKAPKRLIY**TTSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-18Vk	332	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYLY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-19Vk	333	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**TTFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-1Vk	334	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRRIYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-20Vk	335	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSIRYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-22Vk	336	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYLY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSNYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-23Vk	337	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-24Vk	338	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYLY**WFQQK PGKAPKRWIY**GTFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-27Vk	339	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYLY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-28Vk	340	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSLTYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-2Vk	341	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-31Vk	342	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSIRYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ETSDLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSYYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-32Vk	343	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**STFELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSFYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-33Vk	344	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSWYPLT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S2-36Vk	345	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSIRYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-37Vk	346	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSIRYLY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**HQRTRYPFT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-38Vk	347	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYLY**WFQQ KPGKSPKRLIY**STSGLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**NQRSYYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-39Vk	348	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSIISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSTYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-3Vk	349	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSVSYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-40Vk	350	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIISYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**HQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-41Vk	351	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIMNYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**VQWSLYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-43Vk	352	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSIGYLY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-44Vk	353	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSIISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**HQRSSYPCT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-45Vk	354	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYLY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**HQRSRYPFT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-46Vk	355	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQ KPGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-47Vk	356	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSIRYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-48Vk	357	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQ KPGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-4Vk	358	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYLY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**HQRSSYPYT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S2-51Vk	359	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**NQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-52Vk	360	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**NQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-53Vk	361	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQIIGYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-55Vk	362	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSINYID**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**LQRNNYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-56Vk	363	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQ KPGKSPKRLIY**STSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRTSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-58Vk	364	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYLY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATSELQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-59Vk	365	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSLYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-5Vk	366	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSVRYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ETSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-60Vk	367	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYLY**WFQQ KPGKSPKRLIY**TTFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-61Vk	368	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**STSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-62Vk	369	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-64Vk	370	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-65Vk	371	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQIMSYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-67Vk	372	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQIINDLF**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTFDLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC**QQRTHYPIT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S2-6Vk	373	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-71Vk	374	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**GTFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-72Vk	375	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**AQRSGYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-73Vk	376	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSIRYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-75Vk	377	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSLSYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRNFYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-76Vk	378	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQIISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**GTSQLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSRYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-77Vk	379	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSDLQSGVPS**RFSGSRSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-78Vk	380	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSLYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-82Vk	381	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSLSYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSWYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-83Vk	382	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSINYLY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSNYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-84Vk	383	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSIINYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-85Vk	384	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSIYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-86Vk	385	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSLLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**LQRSRYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-87Vk	386	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSIISYID**WYQQK PGKAPKRWIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**LQRSIYPPT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S2-89Vk	387	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-8Vk	388	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSLSYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSNYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-93Vk	389	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSILSYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPWT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-96Vk	390	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S2-9Vk	391	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-10Vk	392	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSNYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-11Vk	393	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQIISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSTYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-12Vk	394	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-13Vk	395	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSVSYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**DTSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**LQQSIYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-14Vk	396	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSFYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-15Vk	397	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIS**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**LQTAIYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-16Vk	398	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSSYPFT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-17Vk	399	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSVNYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSFYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-1Vk	400	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSSYPYT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S3-21Vk	401	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSLNYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELASGVPS**RFSGSRSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRMYYPQT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-23Vk	402	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**GTSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRNSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-24Vk	403	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-27Vk	404	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-29Vk	405	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-2Vk	406	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-30Vk	407	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-33Vk	408	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRTSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-34Vk	409	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIVSYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-37Vk	410	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**PTFDLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSMYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-38Vk	411	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSRYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-41Vk	412	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-44Vk	413	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSIGYLY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-46Vk	414	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSNYPLT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S3-47Vk	415	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-48Vk	416	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-49Vk	417	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-4Vk	418	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSIDYLY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSQLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSTYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-50Vk	419	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSVSYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-52Vk	420	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-53Vk	421	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSIGYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-54Vk	422	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQIISYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**LQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-55Vk	423	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQK PGKSPKRLIY**ETSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPFT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-57Vk	424	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSIGYIY**WFQQK PGKSPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-58Vk	425	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSISYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPPT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-59Vk	426	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSDLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSNYPIT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-60Vk	427	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSIISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-62Vk	428	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J425M2S3-63Vk	429	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-65Vk	430	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**STFELQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-66Vk	431	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-6Vk	432	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSIYPYT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-70Vk	433	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSINYIY**WFQQK PGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSMYPFT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-7Vk	434	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYLY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDHTLTISS LQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J425M2S3-9Vk	435	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSINYLY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**HQRTNYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-10Vk	436	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSIPYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**GTSGLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRTSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-11Vk	437	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIRRFIN**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQWSSYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-12Vk	438	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGSISYIY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ETFDLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRAIYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-14Vk	439	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDSINYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**STSDLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**LQLSRYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-15Vk	440	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGSISYIY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ETFELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**YQKNIYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-18Vk	441	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGSINYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**GTSYLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-20Vk	442	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC**NQRSRYPPT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J427M2S2-21Vk	443	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSSIKSYLN**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQWRNYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-23Vk	444	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSDSISYIS**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQPGIYPGT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-24Vk	445	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIFSYLF**WYQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQGSRYPDT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-27Vk	446	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGINNYLN**WFQQ KPGKSPKRWIY**ATSELQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQWGSYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-29Vk	447	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDIVSYIY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATSGLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-30Vk	448	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSISYIY**WFQQK PGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYYC**HQRSYYPLT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-31Vk	449	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGSIGDLD**WFQQ KPGKAPKRLIY**STFWLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSIYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-33Vk	450	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-34Vk	451	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQLGSYPDT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-35Vk	452	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGIISSID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQWMSYPLT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-36Vk	453	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSINYIY**WFQQ KPGKSPKRLIY**STSDLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSIYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-37Vk	454	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDISSYLN**WFQQ KPGKSPKRLIY**RTSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQWSSYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-39Vk	455	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**YQKKLYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-4Vk	456	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J427M2S2-6Vk	457	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDISSYLN**WFQQ KPGKSPKRLIY**RTSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQLGSYPDT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-7Vk	458	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDSVSYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-8Vk	459	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGSVSNID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFHLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**LQRGSYPGT**FGQGTKLEIK
J427M2S2-9Vk	460	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGIISYIG**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQPGIYPGT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-17Vk	461	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIISYIN**WYQQ KPGKAPKRLIY**STSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQQGSYPDT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-1Vk	462	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYLY**WFQQ KPGKAPKRLIY**RTSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQWSSYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-20Vk	463	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDISSYLN**WFQQ KPGKAPKRLIY**PTFELQS**GVPSRFSSSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**LQFSIYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-25Vk	464	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQDSIRYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**YQGTIYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-33Vk	465	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGINGYIY**WFQQ KPGKAPKRLFY**STFELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSFYPLT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-34Vk	466	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGIISSID**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**SQMSSYPHT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-37Vk	467	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-38Vk	468	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSSISYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSRYPYT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-40Vk	469	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSIISNLY**WFQQ KPGKAPKRWIY**QTFELAS**GVPSRFSGSESGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**YQGSTYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-46Vk	470	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYIY**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSIYPIT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J427M2S3-48Vk	471	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDISSYLN**WFQQ KPGKSPKRLIY**RTSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQFSSYPQT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-49Vk	472	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-50Vk	473	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSSSINYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSIYPLT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-51Vk	474	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIVSYLY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-56Vk	475	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDSISYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTFELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSRYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-60Vk	476	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQTSLSAIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**MTSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**YQSSRYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-62Vk	477	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYLQ**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**LQVSSYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-65Vk	478	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGIISSID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFALQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**SQMSSYPHT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-66Vk	479	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGSINYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-67Vk	480	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-68Vk	481	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSFYPLT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-69Vk	482	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQGIISYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**YQKSIYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-6Vk	483	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSEIVSYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-71Vk	484	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGSLRYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPLT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J427M2S3-73Vk	485	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGSIRDLY**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**YQKSTYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-74Vk	486	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSINYLY**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTFYLAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**YQKSTYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-75Vk	487	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQSSIRYLY**WYQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRDIYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-78Vk	488	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIGSYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-80Vk	489	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGSIRDLY**WFQQ KPGKAPKRWIY**QTSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQVSSYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-81Vk	490	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQASISYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**DTFELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-84Vk	491	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTITC**RASQVSISYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-85Vk	492	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDISSYLN**WFQQ KPGKSPKRLIY**RTSELQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSFYPLT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-87Vk	493	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSDIFSCIF**WFQQ KPGKAPKRLIY**ETFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**LQWSSYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-88Vk	494	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGIGSYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQRSSYPYT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-8Vk	495	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIKGYLN**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELQS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQWSKYPWT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-92Vk	496	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQFSSYPQT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-94Vk	497	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIGSYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**YQDSRYPPT**FGQGTKLEIK
J427M2S3-9Vk	498	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASQDSIRYIY**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**NQRSNYPYT**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J439M1S2(H)3-A12Vk	499	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSLSYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSIYPYT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3-B37Vk	500	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYID**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**HQIGSYPGT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3-B5Vk	501	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYVD**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQIGIYPRT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3-B7Vk	502	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASSGIIGYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3-C20Vk	503	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGINRYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3-C5Vk	504	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIGSYIY**WFQQ KPGKAPKRWIY**ATSELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**QQRSSYPIT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3-D10Vk	505	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIRSYID**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGNYPGT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)3-D40Vk	506	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSASVRYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R4-A3Vk	507	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIRSYID**WFQQ KPGKSPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGNYPGT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R4-A6Vk	508	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGSNCYLD**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATSELAS**GVPSRFSSSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**HQLSSYPNT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R4-B11Vk	509	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDINSYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**HQLGSYPRT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R4-D11Vk	510	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGSISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R5-E2Vk	511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R5-E6Vk	512	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK

Clon	SEQ ID NO:	VL
J439M1S2(H)R5-E9Vk	513	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIFSYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R5-F5Vk	514	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSSSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**HQLGSYPGT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R5-G10Vk	515	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R5-H2Vk	516	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIPSYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQLGSYPRT**FGQGTKLEIK
J439M1S2(H)R5-H4Vk	517	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPETFGHGTKLEIK**
J439M1S2-11Vk	518	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2-20Vk	519	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S2-7Vk	520	DIQMTQSPSSLSVSVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S3R4-22Vk	521	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPETFGQGAKLEIK**
J439M1S3R4-9Vk	522	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S3R5-10Vk	523	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFELAS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC**HQLGSYPDT**FGQGTKLEIK
J439M1S3R5-15Vk	524	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGSISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S3R5-37Vk	525	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPDT**FGQGTKLEIK
J439M1S3R5-5Vk	526	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITC**RASSGIISYID**WFQQ KPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GVPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYC**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK

CUADRO 10

Residuos de aminoácidos observados en anticuerpo anti-IL-17 madurado de afinidad h10F7

h10f7 Región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 811)	
h10f7VH.1	1**2**3**4**5678901234567890123**4**5**6**7**8**9**0**1**2**3**4**5**6**7**8**9**0**1**2**3**4**5**6**7**8**9**0**1**2**a34567**8**9**0**1 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQ** DE M I D SL S IY A M E N P
	2**3**456**7**8**9**0**1**2**3**4**5**6**7**8**9**012abc34567890**1**2**3**4567890abcd1234567890123 **KFD**GRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS V I DKWDGLE I I SMFW YN C W Y SD E F V L L E N S S N M Q F F A H R A F M K H
h10f7 Región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 812)	
H10f7Vk .1a	1**2**3**4**567890123456789012345678**9**012**3**4**5**6**7**8**9**012**3**4**5**6**7**8**9**012345678901 DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASS-SISYIY**WFQQKPGKSPKRWIY**ATFELAS**GVPSR M R QGIRRCLD Y A L R SD Q K SVSNSVN E A DLVGD F D Y Q NTN S S G A FPP Q G Q I GLI G T W V LDF Q L T PCA P H E K M M
	23**4**567890**1**234567890123456**7**8**9**0**1**23**4**567890123456a FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC**HQRSSYPWT**FGQGTKLEIK R VGN E Q WTI L L LMR G N MNF F Y KRT Y S FKY P V PAL I A GDM D S W R Q K H I H Q T G N D C

Los siguientes se convierten en IgG para caracterización adicional.

CUADRO 11

Secuencias VH anti-IL17 individuales de clones convertidos

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
h10f7VH.1a.g1m **VH**		**527**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIHW**VRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YYRYESFYGMDY**WGQGTTVTVSS
h10f7VH.1a.g1m **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:527	**DYEIH**
h10f7VH.1a.g1m **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:527	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
h10f7VH.1a.g1m **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:527	**YYRYESFYGMDY**
J439M1S3R5#10 **VH**		**528**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFD**DYEIH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWDSFYGMDY**WGQGTTVTVSS
J439M1S3R5#10 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:528	**DYEIH**
J439M1S3R5#10 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:528	**VNDPESGGTFYNQKFDG**

	Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
				123456789**0**123456789**0**123456789**0**
528	J439M1S3R5#10 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:528	**YDKWDSFYGMDY**
529	J439M1S3R5#11 **VH**		**529**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YSKWDSFDGMDY**WGQGTTVTVSS
529	J439M1S3R5#11 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:529	**DYEIH**
529	J439M1S3R5#11 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:529	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
530	J439M1S3R5#11 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:529	**YSKWDSFDGMDY**
530	J439M1S2(H)3#A6 **VH**		**530**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPDSGGTLYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**WGQGTTVTVSS
530	439M1S2(H)3#A6 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:530	**DYEIH**
530	439M1S2(H)3#A6 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:530	**VNDPDSGGTLYNQKFDG**
531	439M1S2(H)3#A6 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:530	**YDKWYSFEGMDI**
	J439M1S2(H)3#A11 **VH**		**531**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WVRQAPGQGLEWIG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLSADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**WGQGTTVTVSS
531	J439M1S2(H)3#A11 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:531	**DYEIH**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
J439M1S2(H)3#A11 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:531	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H)3#A11 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:531	**YDKYWSFEGMDY**
J439M1S2(H)3#A16 **VH**		**532**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**WGQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3#A16 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:532	**DYEIH**
J439M1S2(H)3#A16 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:532	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H)3#A16 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:532	**DKWYSFEGMDI**
J439M1S2(H)3#B13 **VH**		**533**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFS**DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKYWSFEGMDY**WGQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3#B13 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:533	**DYEIH**
J439M1S2(H)3#B13 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:533	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H)3#B13 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:533	**DKYWSFEGMDY**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**123456789**0**
J439M1S2(H)3#B20 **VH**		**534**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT**DYEIH**WVRQAPGQGLEWMG**VNDPESGGTFYNQKFDG**RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR**YDKWYSFEGMDI**WGQGTTVTVSS
J439M1S2(H)3#B20 **VH**	**CDR-H1**	Residuos 31-35 de SEQ ID NO.:534	**DYEIH**
J439M1S2(H)3#B20 **VH**	**CDR-H2**	Residuos 50-66 de SEQ ID NO.:534	**VNDPESGGTFYNQKFDG**
J439M1S2(H)3#B20 **VH**	**CDR-H3**	Residuos 99-110 de SEQ ID NO.:534	**DKWYSFEGMDI**

CUADRO 12

Secuencia VL anti-IL-17 de clones individuales

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			12345678901234567890123456789**0**
J439M1S3 R5#10 **VL**		**535**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGS ISYID**WFQQKPGKAPKRLIY**ATFELAS**GV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C**HQLGSYPDT**FGQGTKLEIK
J439M1S3 R5#10 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:535	**SASSGSISYID**
J439M1S3 R5#10 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:535	**ATFELAS**
J439M1S3 R5#10 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89 -97 de SEQ ID NO.:535	**HQLGSYPDT**
J439M1S3 R5#11 **VL**		**536**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**RASSGI ISYID**WFQQKPGKAPKRLIY**ATFDLAS**GV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY C**RQVGSYPET**FGQGTKLEIK
J439M1S3 R5#11 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:536	**RASSGIISYID**
J439M1S3 R5#11 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:536	**ATFDLAS**
J439M1S3 R5#11 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89 -97 de SEQ ID NO.:536	**RQVGSYPET**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
J427 M2S3 #12 **VL**		**537**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSGI ISSID**WFQQKPGKAPKRLIY**ATFALQS**GV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C**SQMSSYPHT**FGQGTKLEIK
J427 M2S3 #12 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:537	**SASSGIISSID**
J427 M2S3 #12 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:537	**ATFALQS**
J427 M2S3 #12 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89 -97 de SEQ ID NO.:537	**SQMSSYPHT**
J427 M2S3 #27 **VL**		**538**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASSDI SSYLN**WFQQKPGKSPKRLIY**RTSELQS**GV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY C**QQWSSYPWT**FGQGTKLEIK
J427 M2S3 #27 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:538	**SASSDISSYLN**
J427 M2S3 #27 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:538	**RTSELQS**
J427 M2S3 #27 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89 -97 de SEQ ID NO.:538	**QQWSSYPWT**

Región de proteína		SEQ ID NO	**Secuencia**
			123456789**0**123456789**0**1234567890
J439M1S2 (H)3#A6 **VL**		**539**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**SASQGI RSYID**WFQQKPGKSPKRLIY**ATFDLAS**GV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY C**RQVGNYPGT**FGQGTKLEIK
J439M1S2 (H)3#A6 **VL**	**CDR -L1**	Residuos 24-34 de SEQ ID NO.:539	**SASQGIRSYID**
J439M1S2 (H)3#A6 **VL**	**CDR -L2**	Residuos 50-56 de SEQ ID NO.:539	**ATFDLAS**
J439M1S2 (H)3#A6 **VL**	**CDR -L3**	Residuos 89 -97 de SEQ ID NO.:539	**RQVGNYPGT**

CUADRO 13

Clones scFv madurados de afinidad h10F7 convertidos a IgG de longitud completa

Nombre del clon ScFv	Plásmido HC	Plásmido LC	Nombre (proteína) IgG de longitud completa
J427 M2S3 #12	pHybE-h10F7VH.1a.g1m	pHybE-hCk V3 J427 M2S3 #12	h10F7-M12
J427 M2S3 #27	pHybE-h10F7VH.1a.g1m	pHybE-hCk V3 J427 M2S3 #27	h10F7-M27
J439M1S3R5#10	pHybE-hCg1,z,non-a,mut(234,235) V2 J439M1S3R5#10	pHybE-hCk V3 J439M1S3R5#10	h10F7-M10
J439M1S3R5#11	pHybE-hCg1,z,non-a,mut(234,235) V2 J439M1S3R5#11	pHybE-hCk V3 J439M1S3R5#11	h10F7-M11
J439M1S2(H)3 #A6	pHybE-hCg1,z,non-a,mut(234,235) V2 J439M1S2(H)3 #A6	pHybE-hCk V3 J439M1S2(H)3#A6	h10F7-A6
J439M1S2(H)3 #A11	pHybE-hCg1,z,non-a,mut(234,235) V2 J439M1S2(H)3 #A11	pHybE-hCk V3 J439M1S3R5#11	h10F7-A11
J439M1S2(H)3 #A16	pHybE-hCg1,z,non-a,mut(234,235) V2 J439M1S2(H)3 #A16	pHybE-hCk V3 J439M1S2(H)3#A6	h10F7-A16
J439M1S2(H)3 #B13	pHybE-hCg1,z,non-a,mut(234,235) V2 J439M1S2(H)3 #B13	pHybE-hCk V3 J439M1S3R5#11	h10F7-B13
J439M1S2(H)3 #B20	pHybE-hCg1,z,non-a,mut(234,235) V2 J439M1S2(H)3 #B20	pHybE-hCk V3 J439M1S3R5#11	h10F7-B20

Caracterización funcional de proteínas DVD-Ig TNF/IL-17

Protocolo de ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA) IL-17

El siguiente protocolo se utiliza para caracterizar la unión de anticuerpos IL-17 para IL-17 humano por ensayo inmunosorbente enlazado por enzima (ELISA). Se recubrió una placa de ELISA con 50 µl por pocillo de IgG-Fc anti ratón de cabra a 2µg/ml, durante la noche a 4°C. La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween. 50 µl de Mab diluido a 1µg/ml en PBS/BSA al 0.1% se agregó a los pocillos adecuados y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween. 50 µl de biotina-IL-17 humana diluida en serie se agregó a los pocillos adecuados y se incubó durante 1 hora a RT. La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween. 50 µl de estreptavidina-HRP diluida 1:10,000 en PBS/BSA al 0.1% se agregó a los pocillos adecuados y se incubaron durante 1

hora a RT. La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween. 50 µl de TMB se agregaron a los pocillos adecuados y la reacción se dejó continuar durante 1 minuto. La reacción se detuvo con 50 µl / pocillo de H2SO4 2N y se leyó la absorbancia a 450 nm.

CUADRO 14

Determinación de afinidad de unión de anticuerpos IL-17 a IL-17 humano por ELISA

Nombre de Proteína	EC50
IL17-h10F7M10 hIgG1/K mut	0.03 nM
IL17-h10F7M11 hIgG1/K mut	0.04 nM
IL17-h10F7M-A6 hIgG1/K mut	0.08 nM
IL17-h10F7M-A11 hIgG1/K mut	0.04 nM
IL17-h10F7M-A16 hIgG1/K mut	0.07 nM
IL17-h10F7M-B13 hIgG1/K mut	0.06 nM
IL17-h10F7M-B20 hIgG1/K mut	0.07 nM

Medida de afinidad de Anti DVD-Ig TNF/IL-17 por resonancia de plasmón de superficie

La unión de anticuerpos a proteínas IL-17 recombinantes purificadas se determina por las mediciones basadas en la resonancia de plasmón de superficie con un instrumento de Biacore® T200 (GE Healthcare) utilizando HBS-EP de ejecución (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM de NaCl, 3 mM EDTA y 0.005% de agente tensoactivo P20) que contiene 0.1 mg/ml de BSA a 25°C. Todos los químicos obtenidos de Biacore® AB (GE Healthcare) o de otra manera de una fuente como se describe en el texto. Aproximadamente 5000 RU de anticuerpo policlonal específico de fragmento IgG anti-humano de cabra (Fcg) (Pierce Biotecnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) se inmoviliza directamente a través de un chip biosensor de grado de investigación CM5 usando un kit de acoplamiento de amina estándar de acuerdo con instrucciones del fabricante y los procedimientos a 25 µg/ml. Radicales que no reaccionan en la superficie del biosensor son bloqueados con etanolamina. Superficie de dextrano carboximetilo modificado en celda de flujo 2, 3 y 4 son

usados como una superficie de reacción. Dextrano carboximetilo modificado con IgG de cabra en la celda de flujo 1 es utilizado como la superficie de referencia. Para análisis cinético, ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 se ajustaron simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las seis inyecciones (usando análisis de ajuste global con flotador local para Rmax) con el uso de software v.1.0 de evaluación Biacore T200. Anticuerpos purificados se diluyen en solución salina regulada de pH con HEPES para captura a través de superficies de reacción específica IgG anti-humana de cabra. Anticuerpos que son capturados como ligando (1-5 µg/ml) se inyectan en matrices de reacción a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto. Se monitorea la fase de asociación por 5 minutos, mientras la fase de disociación se monitorea por 10-60 minutos para acomodar las velocidades de disociación más lentas. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, ka (unidad $M^{-1}s^{-1}$) y kd (unidad s^{-1}) se determinan bajo una velocidad de flujo continua de 50 ul/minuto. Constantes de velocidad se derivan por hacer mediciones de unión cinética en seis concentraciones de antígeno diferentes que varían de 0.78 nM a 100 nM, dependiendo de las especies de IL-17 analizadas. La Asociación ka, velocidad de disociación Kd y constante de disociación de equilibrio se calculan con el uso del mismo software v.1.0 de evaluación Biacore T200.

CUADRO 15

		IL17AA Humano			Cyno IL17AA		
Anticuerpo	**Sobrenombre#**	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
IL17-h10F7M10 hIgG1/K mut	PR-1262986	4.45E+06	6.80E-06	1.53E-12	4.14E+06	4.40E-06	1.06E-12
IL17-h10F7M11 hIgG1/K mut	PR-1263009	4.53E+06	7.24E-06	1.59E-12	4.50E+06	3.88E-06	8.60E-13
IL17-h10F7M-A6 hIgG1/K mut	PR-1267640	2.99E+06	4.48E-06	1.50E-12			
IL17-h10F7M-A11 hIgG1/K mut	PR-1267637	3.64E+06	7.68E-06	2.10E-12			
IL17-h10F7M-A16 hIgG1/K mut	PR-1267643	2.99E+06	4.52E-06	1.51E-12			
IL17-h10F7M-B13 hIgG1/K mut	PR-1267636	2.68E+06	6.88E-06	2.56E-12			
IL17-h10F7M-B20 hIgG1/K mut	PR-1267635	2.92E+06	6.27E-06	2.14E-12			

Ensayo para secreción de IL-6 inducida por IL-17A e IL-17A/F en fibroblastos de prepucio humana primaria HS27

La línea celular HS27 humana (ATCC acceso # CRL-1634) secreta IL-6 en respuesta a IL-17. Se inhibe la secreción de IL-6 inducida por IL-17 mediante la neutralización de anticuerpos anti-IL-17 (véase, por ejemplo, J. Immunol., 155:5483-5486 (1995); Cytokine, 9:794-800 (1997)).

Las células HS27 se mantienen en medio de ensayo: medio de glucosa alta de DMEM (Gibco #11965) con 10% de suero bovino fetal (Gibco #26140), 4 mM L-glutamina, piruvato de sodio 1 mM, penicilina G (100 U/500 ml) y estreptomicina (100 µg/500 ml). Las células son cultivadas en matraces T150 hasta que aproximadamente 80-90% confluente el día del ensayo. IL-17A humano (R & D Systems, #317-IL/CF), o mono cynomolgous (cyno) IL-17A (generado en Abbott) se reconstituyen en PBS estéril sin Ca^{2+} y Mg^{2+} almacenados congelados, recién descongeladas para uso diluidas a 240 pM (4X) o 4nM (4X) para IL-17A/F en el medio de ensayo. Se realizan diluciones seriadas de anticuerpos en una placa separada (concentraciones 4X), mezcladas con un volumen igual de 240 pM (4X) de huIL-17 o cynoIL-17A o 4 nM (4X) huIL-17A/F y se incuban a 37°C durante 1 hora. Células HS27 (normalmente aproximadamente 20.000 en 50 µl de medio de ensayo) se agregan a cada pozo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Costar #3599), seguido por la adición de 50 µl de anticuerpo pre-incubado más mezcla de IL-17. La concentración final de humano y cynoIL-17A es 60 pM. La concentración final de IL-17A/F humano es 1 nM. Las células se incuban durante aproximadamente 24 horas a 37°C. Luego se recogieron los sobrenadantes de medios. Se mide el nivel de neutralización de IL-17 por determinación de las cantidades de IL-6 en el sobrenadante utilizando un kit comercial de Meso Scale Discovery (cat # L411AKB-1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtienen valores de IC50 utilizando logaritmo de anticuerpo frente a ajuste de pendiente variable de cantidad de IL-6.

Ensayo para secreción de IL-6 inducida por TNF-α e IL-17 de línea celular de fibroblastos embriónicos de murina (NIH3T3)

La línea celular N1H3T3 de murina (ATCC acceso # CRL-1658) secreta IL-6 en respuesta a murina IL-17A de rata o conejo y TNFα de murina (R&D Systems, Cat# 410-MT). Se inhibe la secreción de IL-6 inducida por IL-17 mediante la neutralización de anticuerpos anti-IL-17.

Las células N1H3T3 se mantienen en medio de ensayo: DMEM (Invitrogen Cat#11965-092) con 10% de suero bovino fetal (Gibco #26140-079), 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM L-glutamina, piruvato de sodio 1 mM, penicilina G (100 U/500 ml) y estreptomicina (100 µg/500 ml). Las células son cultivadas en matraces T150 hasta que aproximadamente 80-90% confluente el día del ensayo. IL-17A de rata IL17A (Prospec bio, Cat# CYT-542) se reconstituyen en PBS estéril sin Ca^{2+} y Mg^{2+}, con 0.1% de BSA, forman alícuotas y se almacenan congeladas en 100 µg/ml. IL17A de conejo (Abbott, A-1239293.0) se forma en alícuotas y almacenan congeladas a 260 µg/mL. TNF-α de murina se reconstituye en 0.1% de BSA/PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} en una concentración de 10 µg/mL, se forman alícuotas y almacenan congeladas. Anticuerpos de IL-17 recién descongeladas se diluyen a 200 µg/ml (4X) en el medio de ensayo. Se realizan diluciones seriadas de anticuerpos en una placa separada (concentraciones 4X), se mezclan con igual volumen de 40 ng/ml (4X) de IL-17A de murina o rata o 100 ng/mL de IL-17A de conejo, y se incuban a 37°C durante 1 hora.

Células NIH3T3 (normalmente aproximadamente 400.000 células en 50 µl de medio de ensayo) se agregan a cada pozo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Costar #3599), seguido de la adición de 50 µl de anticuerpo pre-incubado más mezcla de IL-17. MU TNF-α 5.5 ng/ml (10x) se añade en 11µl de medios a cada pozo. La concentración final de IL-17A es 10 ng/ml para murina y rata y 25 ng/mL para conejo. La concentración final de mu TNFα es 0.55 ng/mL. Las células se incuban durante aproximadamente 24 horas a 37°C. Luego se colectaron los sobrenadantes de medios. Se mide el nivel de neutralización de IL-17 por determinación de las cantidades de IL-6 en el sobrenadante utilizando un kit comercial de Meso Scale Discovery (cat #

K112AKA-4) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtienen valores de IC50 utilizando logaritmo de anticuerpo frente a ajuste de pendiente variable de cantidad de IL-6.

CUADRO 16

Anticuerpo	Humano 60pM	Cyno 60pM	Ratón 3nM	Rata .3nM	Conejo .75nM
IL17-h10F7M11 hIgG1/K mut	40	16	8	83	73
IL17-h10F7M10 hIgG1/K mut	30	12	8	99	81
IL17-h10F7M-A6 hIgG1/K mut	80	29	130	75	121
IL17-h10F7M-A11 hIgG1/K mut	40	18	31	128	123
IL17-h10F7M-A16 hIgG1/K mut	70	11	23	102	117
IL17-h10F7M-B13 hIgG1/K mut	60	9	60	73	113
IL17-h10F7M-B20 hIgG1/K mut	70	27	39	93	124

EJEMPLO 3

Generación de moléculas DVD-Ig anti-TNF/IL-17 novedoso y completamente novedoso

1.1 Construcción de constructos de ADN DVD-Ig TNF/IL-17

Dominios variables de anticuerpo anti-TNF se combinan con múltiples dominios variables del anticuerpo IL-17 al superponer la amplificación de PCR con la intervención de secuencias de ADN de enlazador. Los productos PCR amplificados son sub-clonados en vectores de expresión adecuados para expresión transitoria en células HEK293 y regiones de marco de lectura abierto son confirmadas por secuenciación antes de la expresión de DVD-Ig.

Expresión y producción de proteínas de unión de DVD-Ig TNF/IL17

Después de la confirmación de ADN mediante la secuenciación, todas los constructos de ADN DVD-Ig se ampliaron en E. coli y ADN se purifica mediante Qiagen Hispeed Maxi Prep (CAT #12662, QIAGEN). ADN de DVD-Ig se

transfecta en las células 293E de fase log (0.5 x 10^6/ml, viabilidad >95%) mediante la mezcla de PEI y ADN@ relación 2:1 con 0.2 μg/ml de ADN de cadena pesada y 0.3 de μg/ml de ADN de cadena ligera. Complejo ADN: PEI se forma a temperatura ambiente en campana TC durante quince minutos antes de la adición a las células 293E. Veinticuatro después, 0.5% TN1 se añade a las células 293E. Al quinto día, sobrenadante fue colectado para la medición de titulación de IgG1 humana. Sobrenadante de célula es cosechada en día siete y filtrado mediante filtro PES 0.2 μM. Sobrenadante es purificado utilizando cromatografía de afinidad de sefarosa de proteína A de acuerdo con las instrucciones del fabricante. DVD-Igs purificadas se eluyen de la columna por 0.1M de glicina (pH 2.99) y se dializa en regulador de pH de histidina 15 mM (pH 6.0) inmediatamente. Las proteínas de unión se cuantifican por A280 y se analizan por espectrometría de masas y SEC.

Secuencias de constructos de DVD-Ig TNF/IL-17

Se determina la secuencia de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera de proteínas DVD-Ig capaces de unir TNF humano y hIL-17. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas variables, cadenas ligeras variables y regiones constantes de las proteínas de unión de DVD-Ig TNF/IL-17 se muestran en el cuadro siguiente (cuadro 17). IgG1 humana tipo silvestre e IgG1 mutante con mutaciones leu a ala en posiciones de región de articulación inferior 234, 235 (sistema de numeración EU) han sido probadas y se muestra comparativamente activa en unión a TNF e IL-17.

CUADRO 17

Secuencias de regiones variable y constante de proteínas de unión DVD-Ig TNF/IL-17

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-21-GS10-M11 DVD	**SEQ ID NO.:540**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMG VNDPESGGTFYNQKFDGRVTLT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYSKWDSFDGMDYWGQGT TVTVSS
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:541**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:542**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11Vh	**SEQ ID NO.:543**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:544**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE LIGERA DVD hMAK195-21-GS10-M11 DVD	**SEQ ID NO.:545**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASARHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYKTPFTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASSGIISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFDLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTK LEIKR
hMAK195-21VL	**SEQ ID NO.:546**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASARHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYKTPFTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:547**	GGSGGGGSG
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:548**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSGIISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:549**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-24-GS10-M11 DVD	**SEQ ID NO.:550**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMG VNDPESGGTFYNQKFDGRVTLT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYSKWDSFDGMDYWGQGT TVTVSS
hMAK195-24Vh	**SEQ ID NO.:551**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:552**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11Vh	**SEQ ID NO.:553**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
CH CG1 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:554**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD hMAK195-24-GS10-M11 DVD	**SEQ ID NO.:555**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASTLHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYRTPFTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASSGIISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFDLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTK LEIKR
hMAK195-24VL	**SEQ ID NO.:556**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASTLHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYRTPFTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:557**	GGSGGGGSG
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:558**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSGIISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:559**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-21-GS10-M10 DVD	**SEQ ID NO.:560**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFDDYEIHWVRQAPGQGLEWIG VNDPESGGTFYNQKFDGRATLT ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYDKWDSFYGMDYWGQGT TVTVSS
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:561**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:562**	GGGGSGGGGS
H10F7-M10Vh	**SEQ ID NO.:563**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFDDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWDSFYGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:564**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD hMAK195-21-GS10-M10 DVD	**SEQ ID NO.:565**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASARHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYKTPFTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSGSISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFELASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCHQLGSYPDTFGQGTK LEIKR

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
hMAK195-21VL	**SEQ ID NO.:566**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QLVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWAS ARHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYKTPFTFGQGTKL EIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:567**	GGSGGGGSG
H10F7-M10VL	**SEQ ID NO.:568**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS SGSISYIDWFQQKPGKAPKRLIYATF ELASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQLGSYPDTFGQGTKL EIKR
CL	**SEQ ID NO.:569**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-24-GS10-M10 DVD	**SEQ ID NO.:570**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSGIW ADGSTHYADTVKSRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQHGPV AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF DDYEIHWVRQAPGQGLEWIGVNDPES GGTFYNQKFDGRATLTADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCTRYDKWDSFYG MDYWGQGTTVTVSS
hMAK195-24Vh	**SEQ ID NO.:571**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSGIW ADGSTHYADTVKSRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQHGPV AYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:572**	GGGGSGGGGS
H10F7-M10Vh	**SEQ ID NO.:573**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YTFDDYEIHWVRQAPGQGLEWIGVND PESGGTFYNQKFDGRATLTADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCTRYDKWDS FYGMDYWGQGTTVTVSS
CH, CG1234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:574**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE LIGERA DVD hMAK195-24-GS10-M10 DVD	**SEQ ID NO.:575**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASTLHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYRTPFTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSGSISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFELASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCHQLGSYPDTFGQGTK LEIKR
hMAK195-24VL	**SEQ ID NO.:576**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASTLHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYRTPFTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:577**	GGSGGGGSG
H10F7-M10VL	**SEQ ID NO.:578**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSGSISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFELASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQLGSYPDTFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:579**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-21-GS10-A6 DVD	**SEQ ID NO.:580**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWIG VNDPDSGGTLYNQKFDGRVTLT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYDKWYSFEGMDIWGQGT TVTVSS
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:581**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:582**	GGGGSGGGGS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
H10F7-A6 Vh	**SEQ ID NO.:583**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPDSGGTLYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWYSFEGMDI WGQGTTVTVSS
CH CG1 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:584**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD hMAK195-21-GS10-A6 DVD	**SEQ ID NO.:585**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASARHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYKTPFTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASQGIRSYIDWFQ QKPGKSPKRLIYATFDLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGNYPGTFGQGTK LEIKR
hMAK195-21VL	**SEQ ID NO.:586**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASARHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYKTPFTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:587**	GGSGGGGSG
H10F7-A6 VL	**SEQ ID NO.:588**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASQGIRSYIDWFQQKPGKSP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGNYPGTFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:589**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-24-GS10-A6 DVD	**SEQ ID NO.:590**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWIG VNDPDSGGTLYNQKFDGRVTLT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYDKWYSFEGMDIWGQGT TVTVSS
hMAK195-24Vh	**SEQ ID NO.:591**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:592**	GGGGSGGGGS
H10F7-A6Vh	**SEQ ID NO.:593**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPDSGGTLYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWYSFEGMDI WGQGTTVTVSS
CH CG1 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:594**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD hMAK195-24-GS10-A6 DVD	**SEQ ID NO.:595**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASTLHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYRTPFTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASQGIRSYIDWFQ QKPGKSPKRLIYATFDLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGNYPGTFGQGTK LEIKR

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
hMAK195-24VL	**SEQ ID NO.:596**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QLVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWAS TLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYRTPFTFGQGTKL EIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:597**	GGSGGGGSG
H10F7-A6 VL	**SEQ ID NO.:598**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS QGIRSYIDWFQQKPGKSPKRLIYATF DLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFATYYCRQVGNYPGTFGQGTKL EIKR
CL	**SEQ ID NO.:599**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-21-GS10-A16 DVD	**SEQ ID NO.:600**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYGVTWVRQAPGKGLEWVSMIW ADGSTHYASSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQHGPV AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSEVQ LVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF SDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVNDPES GGTFYNQKFDGRVTLTADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCTRYDKWYSFEG MDIWGQGTTVTVSS
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:601**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYGVTWVRQAPGKGLEWVSMIW ADGSTHYASSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQHGPV AYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:602**	GGGGSGGGGS
H10F7-A16Vh	**SEQ ID NO.:603**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVND PESGGTFYNQKFDGRVTLTADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCTRYDKWYS FEGMDIWGQGTTVTVSS
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:604**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-24-GS10-A16 DVD	**SEQ ID NO.:605**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMG VNDPESGGTFYNQKFDGRVTLT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYDKWYSFEGMDIWGQGT TVTVSS
hMAK195-24Vh	**SEQ ID NO.:606**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:607**	GGGGSGGGGS
H10F7-A16Vh	**SEQ ID NO.:608**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFSDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWYSFEGMDI WGQGTTVTVSS
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:609**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-21-GS10-A11 DVD	**SEQ ID NO.:610**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWIG VNDPESGGTFYNQKFDGRVTLS ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYDKYWSFEGMDYWGQGT TVTVSS
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:611**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:612**	GGGGSGGGGS
H10F7-A11Vh	**SEQ ID NO.:613**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLSADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKYWSFEGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:614**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-24-GS10-A11 DVD	**SEQ ID NO.:615**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWIG VNDPESGGTFYNQKFDGRVTLS ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYDKYWSFEGMDYWGQGT TVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:616**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSG IWADGSTHYADTVKSRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:617**	GGGGSGGGGS
H10F7-A11Vh	**SEQ ID NO.:618**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWIGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLSADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYD KYWSFEGMDYWGQGTTVTVSS
CH CG1 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:619**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-21-GS10-B13 DVD	**SEQ ID NO.:620**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVTWVRQAPGKGLEWVSM IWADGSTHYASSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR YDKYWSFEGMDYWGQGTTVTVSS
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:621**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVTWVRQAPGKGLEWVSM IWADGSTHYASSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:622**	GGGGSGGGGS
H10F7-B13Vh	**SEQ ID NO.:623**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYD KYWSFEGMDYWGQGTTVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
CH CG1,234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:624**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-24-GS10-B13 DVD	**SEQ ID NO.:625**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSG IWADGSTHYADTVKSRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR YDKYWSFEGMDYWGQGTTVTVSS
hMAK195-24Vh	**SEQ ID NO.:626**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSG IWADGSTHYADTVKSRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:627**	GGGGSGGGGS
H10F7-B13 Vh	**SEQ ID NO.:628**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFSDYEIHWVRQAPGQGLEWMGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYD KYWSFEGMDYWGQGTTVTVSS
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:629**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-21-GS10-B20 DVD	**SEQ ID NO.:630**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMG VNDPESGGTFYNQKFDGRVTLT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYDKWYSFEGMDIWGQGT TVTVSS
hMAK195-21Vh	**SEQ ID NO.:631**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:632**	GGGGSGGGGS
H10F7-B20Vh	**SEQ ID NO.:633**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWYSFEGMDI WGQGTTVTVSS
CH CG1234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:634**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD hMAK195-24-GS10-B20 DVD	**SEQ ID NO.:635**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSG IWADGSTHYADTVKSRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR YDKWYSFEGMDIWGQGTTVTVSS
hMAK195-24Vh	**SEQ ID NO.:636**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSG IWADGSTHYADTVKSRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:637**	GGGGSGGGGS
H10F7-B20Vh	**SEQ ID NO.:638**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYD KWYSFEGMDIWGQGTTVTVSS
CH CG1 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:639**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
VARIABLE PESADA DVD H10F7-M10-GS10-HMAK195-21 DVD	**SEQ ID NO.:640**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFDDYEIHWVRQAPGQGLEWIGV NDPESGGTFYNQKFDGRATLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYD KWDSFYGMDYWGQGTTVTVSSGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAREWQHGPVAYWGQGTLVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
H10F7-M10Vh	**SEQ ID NO.:641**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFDDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWDSFYGMDY WGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:642**	GGGGSGGGGS
HMAK195-21 Vh	**SEQ ID NO.:643**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVTWVRQAPGKG LEWVSMIWADGSTHYASSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:644**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD h10F7-M10-GS10-hMAK195-21 DVD	**SEQ ID NO.:645**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSGSISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFELASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQLGSYPDTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQLVSSAVAWYQ QKPGKAPKLLIYWASARHTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYKTPFTFGQGTK LEIKR
H10F7-M10VL	**SEQ ID NO.:646**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSGSISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFELASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQLGSYPDTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:647**	GGSGGGGSG
HMAK195-21VL	**SEQ ID NO.:648**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQLVSSAVAWYQQKPGKAP KLLIYWASARHTGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHYKTPFTFGQGTKLEIKR

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
CL	**SEQ ID NO.:649**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD H10F7-M10-GS10-HMAK195-24 DVD	**SEQ ID NO.:650**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFDDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWDSFYGMDY WGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSNYGVEWVRQAPGKGL EWVSGIWADGSTHYADTVKSRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAREWQHGPVAYWGQGT LVTVSS
H10F7-M10Vh	**SEQ ID NO.:651**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFDDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWDSFYGMDY WGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:652**	GGGGSGGGGS
HMAK195-24 Vh	**SEQ ID NO.:653**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
CH CG1. 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:654**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE LIGERA DVD h10F7-M10-GS10-hMAK195-24 DVD	**SEQ ID NO.:655**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSA SSGSISYIDWFQQKPGKAPKRLIYA TFELASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCHQLGSYPDTFGQ GTKLEIKRGGSGGGGSGDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCKASQLVSSAV AWYQQKPGKAPKLLIYWASTLHTGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQHYRTPFTFGQGTKLEIKR
H10F7-M10VL	**SEQ ID NO.:656**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSA SSGSISYIDWFQQKPGKAPKRLIYA TFELASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCHQLGSYPDTFGQ GTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:657**	GGSGGGGSG
HMAK195-24VL	**SEQ ID NO.:658**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQLVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYW ASTLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQHYRTPFTFGQ GTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:659**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-1-GS10-H10F7-M11 DVD	**SEQ ID NO.:660**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFANYGIIWVRQAPGQGLEWMGW INTYTGKPTYAQKFQGRVTMTTDTS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKL FTTMDVTDNAMDYWGQGTTVTVSSG GGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGYTFTDYEIHWVRQAP GQGLEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCTRYSKWDSFDGMDYWGQGTT VTVSS
HMAK199-1Vh	**SEQ ID NO.:661**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFANYGIIWVRQAPGQGLEWMGW INTYTGKPTYAQKFQGRVTMTTDTS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKL FTTMDVTDNAMDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:662**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:663**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYS KWDSFDGMDYWGQGTTVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
CH CG1234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:664**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-1-GS10-H10F7-M11DVD	**SEQ ID NO.:665**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISQYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTWPPTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASSGIISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFDLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTK LEIKR
HMAK199-1 VL	**SEQ ID NO.:666**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISQYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTWPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:667**	GGSGGGGSG
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:668**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSGIISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:669**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-1-GS10-H10F7-M10 DVD	**SEQ ID NO.:670**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFDDYEIHWVRQAPG QGLEWIGVNDPESGGTFYNQKF DGRATLTADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRYDKWDSFYGM DYWGQGTTVTVSS
HMAK199-1Vh	**SEQ ID NO.:671**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:672**	GGGGSGGGGS
H10F7-M10 Vh	**SEQ ID NO.:673**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFDDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWDSFYGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:674**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-1-GS10-H10F7-M10DVD	**SEQ ID NO.:675**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISQYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTWPPTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSGSISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFELASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCHQLGSYPDTFGQGTK LEIKR

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
HMAK199-1 VL	**SEQ ID NO.:676**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDISQYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYFCQQGNTWPPTFGQGTKL EIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:677**	GGSGGGGSG
H10F7-M10VL	**SEQ ID NO.:678**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS SGSISYIDWFQQKPGKAPKRLIYATF ELASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCHQLGSYPDTFGQGTKL EIKR
CL	**SEQ ID NO.:679**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-10-GS10-H10F7-M11 DVD	**SEQ ID NO.:680**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFNNYGIIWVRQAPGQGLEWMGWIN TYSGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTST AYMELSSLRSEDTAVYFCARKLFTTM DVTDNAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADE STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYS KWDSFDGMDYWGQGTTVTVSS
HMAK199-10Vh	**SEQ ID NO.:681**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFNNYGIIWVRQAPGQGLEWMGWIN TYSGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTST AYMELSSLRSEDTAVYFCARKLFTTM DVTDNAMDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:682**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:683**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVND PESGGTFYNQKFDGRVTLTADESTST AYMELSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDS FDGMDYWGQGTTVTVSS
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:684**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-10-GS10-H10F7-M11DVD	**SEQ ID NO.:685**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISNFLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASSGIISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFDLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTK LEIKR
HMAK199-10 VL	**SEQ ID NO.:686**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISNFLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:687**	GGSGGGGSG
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:688**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSGIISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:689**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-10-GS10-H10F7-M10 DVD	**SEQ ID NO.:690**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFNNYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYSGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYFCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFDDYEIHWVRQAPG QGLEWIGVNDPESGGTFYNQKF DGRATLTADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRYDKWDSFYGM DYWGQGTTVTVSS
HMAK199-10Vh	**SEQ ID NO.:691**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFNNYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYSGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYFCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:692**	GGGGSGGGGS
H10F7-M10 Vh	**SEQ ID NO.:693**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFDDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWDSFYGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1 ,234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:694**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-10-GS10-H10F7-M10DVD	**SEQ ID NO.:695**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISNFLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSGSISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFELASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCHQLGSYPDTFGQGTK LEIKR
HMAK199-10 VL	**SEQ ID NO.:696**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDISNFLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:697**	GGSGGGGSG
H10F7-M10VL	**SEQ ID NO.:698**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSGSISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFELASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQLGSYPDTFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:699**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-6-GS10-H10F7-M11 DVD	**SEQ ID NO.:700**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFNNYGINWVRQAPGQGLEWM GWINTYTGKPTYAQKFQGRVTMTT DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFC ARKFRNTVAVTDYAMDYWGQGTTV TVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEI HWVRQAPGQGLEWMGVNDPESGGT FYNQKFDGRVTLTADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDSFD GMDYWGQGTTVTVSS
HMAK199-6Vh	**SEQ ID NO.:701**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFNNYGINWVRQAPGQGLEWM GWINTYTGKPTYAQKFQGRVTMTT DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFC ARKFRNTVAVTDYAMDYWGQGTTV TVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:702**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:703**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC TRYSKWDSFDGMDYWGQGTTVTVS S
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:704**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-6-GS10-H10F7-M11DVD	**SEQ ID NO.:705**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDIYDVLNWYQQKPGKAPKLLI YYASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQGITLPP TFGQGTKLEIKRGGSGGGGSGDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASS GIISYIDWFQQKPGKAPKRLIYAT FDLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYCRQVGSYPETFG QGTKLEIKR

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
HMAK199-6 VL	**SEQ ID NO.:706**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DIYDVLNWYQQKPGKAPKLLIYYASRL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQGITLPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:707**	GGSGGGGSG
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:708**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASS GIISYIDWFQQKPGKAPKRLIYATFDL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:709**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-6-GS10-H10F7-M10 DVD	**SEQ ID NO.:710**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFNNYGINWVRQAPGQGLEWMGWINTY TGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYFCARKFRNTVAVTD YAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYT FDDYEIHWVRQAPGQGLEWIGVNDPES GGTFYNQKFDGRATLTADKSTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCTRYDKWDSFYGMD YWGQGTTVTVSS
HMAK199-6Vh	**SEQ ID NO.:711**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFNNYGINWVRQAPGQGLEWMGWINTY TGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYFCARKFRNTVAVTD YAMDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:712**	GGGGSGGGGS
H10F7-M10 Vh	**SEQ ID NO.:713**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFDDYEIHWVRQAPGQGLEWIGVNDPE SGGTFYNQKFDGRATLTADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCTRYDKWDSFYGM DYWGQGTTVTVSS
CH CG1 ,234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:714**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-6-GS10-H10F7-M10 DVD	**SEQ ID NO.:715**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIYDVLNWYQQKPGKAP KLLIYYASRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGITLPPTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCSASSGSISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFELASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCHQLGSYPDTFGQGTK LEIKR
HMAK199-6 VL	**SEQ ID NO.:716**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIYDVLNWYQQKPGKAP KLLIYYASRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQGITLPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:717**	GGSGGGGSG
H10F7-M10VL	**SEQ ID NO.:718**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CSASSGSISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFELASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYC HQLGSYPDTFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:719**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-4-GS10-H10F7-M11 DVD	**SEQ ID NO.:720**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFNNYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFNTVAVTDNA MDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYEIHWVRQAPG QGLEWMGVNDPESGGTFYNQKF DGRVTLTADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGM DYWGQGTTVTVSS
HMAK199-4Vh	**SEQ ID NO.:721**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFNNYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFNTVAVTDNA MDYWGQGTTVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:722**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11Vh	**SEQ ID NO.:723**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1, 234,235 MUT Z NONA	**SEQ ID NO.:724**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-4-GS10-H10F7-M11 DVD	**SEQ ID NO.:725**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIENYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKRGG SGGGGSGDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASSGIISYIDWFQ QKPGKAPKRLIYATFDLASGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTK LEIKR
HMAK199-4 VL	**SEQ ID NO.:726**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIENYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:727**	GGSGGGGSG
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:728**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSGIISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:729**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK195-24-SS-H10F7-M11 DVD	**SEQ ID NO.:730**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWV SGIWADGSTHYADTVKSRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REWQHGPVAYWGQGTLVTVSSASTKGPEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGL EWMGVNDPESGGTFYNQKFDGRVT LTADESTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCTRYSKWDSFDGMDYWGQGTTV TVSS
HMAK195-24 Vh	**SEQ ID NO.:731**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWV SGIWADGSTHYADTVKSRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA REWQHGPVAYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:732**	ASTKGP
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:733**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC TRYSKWDSFDGMDYWGQGTTVTVS S
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:734**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD HMAK195-24-SS-H10F7-M11DVD	**SEQ ID NO.:735**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQLVSSAVAWYQQKPGKAPKLLI YWASTLHTGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYRTPF TFGQGTKLEIKRTVAAPDIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCRASSGIIS YIDWFQQKPGKAPKRLIYATFDLA SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCRQVGSYPETFGQGTK LEIKR

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
HMAK195-24 VL	**SEQ ID NO.:736**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ LVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTL HTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYRTPFTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:737**	TVAAP
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:738**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASS GIISYIDWFQQKPGKAPKRLIYATFDL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:739**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-4-SS-H10F7-M11 DVD	**SEQ ID NO.:740**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFNNYGIIWVRQAPGQGLEWMGWINTY TGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARKLFNTVAVTD NAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPEVQLV QSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDY EIHWVRQAPGQGLEWMGVNDPESGGTF YNQKFDGRVTLTADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDYWGQ GTTVTVSS
HMAK199-4 Vh	**SEQ ID NO.:741**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFNNYGIIWVRQAPGQGLEWMGWINTY TGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARKLFNTVAVTD NAMDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:742**	ASTKGP
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:743**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVNDPE SGGTFYNQKFDGRVTLTADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGM DYWGQGTTVTVSS
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:744**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE LIGERA DVD HMAK199-4-SS-H10F7-M11DVD	**SEQ ID NO.:745**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIENYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKRTV AAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASSGIISYIDWFQQKPG KAPKRLIYATFDLASGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCRQVGSYPETFGQGTKLEIK R
HMAK199-4 VL	**SEQ ID NO.:746**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIENYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:747**	GGSGGGGSG
H10F7-M11VL	**SEQ ID NO.:748**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSGIISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGSYPETFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:749**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD H10F7-M11-HMAK199-4.4 DVD	**SEQ ID NO.:750**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSSASTKGPEVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFNNYGIIWVRQAPGQGLEWMG WINTYTGKPTYAQKFQGRVTMT TDTSTSTAYMELSSLRSEDTAV YYCARKLFNTVAVTDNAMDYWG QGTTVTVSS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:751**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:752**	ASTKGP
HMAK199-4 Vh	**SEQ ID NO.:753**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFNNYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFNTVAVTDNA MDYWGQGTTVTVSS
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:754**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VARIABLE LIGERA DVD H10F7-M11-HMAK199-4.4 DVD	**SEQ ID NO.:755**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASSGIISYIDWFQQKPGKAP KRLIYATFDLASGVPSRFSGSG SGTDYTLTISSLQPEDFATYYC RQVGSYPETFGQGTKLEIKRTV AAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDIENYLNWYQQKPG KAPKLLIYYTSRLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YFCQQGNTQPPTFGQGTKLEIK R
H10F7-M11 VL	**SEQ ID NO.:756**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIENYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:757**	TVAAP
HMAK199-4 VL	**SEQ ID NO.:758**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQDIENYLNWYQQKPGKAP KLLIYYTSRLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISSLQPEDFATYFC QQGNTQPPTFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:759**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD H10F7-M11-HMAK199-4.8 DVD	**SEQ ID NO.:760**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYS KWDSFDGMDYWGQGTTVTVSSGGGG SGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVK VSCKASGYTFNNYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQGRVT MTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARKLFNTVAVTDNAMDYWGQGTT VTVSS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:761**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYS KWDSFDGMDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:762**	GGGGSGGGGS
HMAK199-4 Vh	**SEQ ID NO.:763**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFNNYGIIWVRQAPGQGLEWMGW INTYTGKPTYAQKFQGRVTMTTDTS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKL FNTVAVTDNAMDYWGQGTTVTVSS
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:764**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
VARIABLE LIGERA DVD H10F7-M11-HMAK199-4.8 DVD	**SEQ ID NO.:765**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SSGIISYIDWFQQKPGKAPKRLIYA TFDLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTI SSLQPEDFATYYCRQVGSYPETFGQ GTKLEIKRGGSGGGGSGDIQMTQSP SSLSASVGDRVTITCRASQDIENYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYFCQQGNTQPPTFGQGTKLEIKR

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
H10F7-M11 VL	**SEQ ID NO.:766**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASS GIISYIDWFQQKPGKAPKRLIYATFDL ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCRQVGSYPETFGQGTKLEIKR
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:767**	GGSGGGGSG
H HMAK199-4VL	**SEQ ID NO.:768**	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DIENYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYFCQQGNTQPPTFGQGTKLEIKR
CL	**SEQ ID NO.:769**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-1-h10F7-M11.8 QL DVD	**SEQ ID NO.:770**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFANYGIIWVRQAPGQGLEWMGWINTY TGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARKLFTTMDVTD NAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSE VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYT FTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVNDPES GGTFYNQKFDGRVTLTADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGMD YWGQGTTVTVSS
HMAK199-1 Vh	**SEQ ID NO.:771**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFANYGIIWVRQAPGQGLEWMGWINTY TGKPTYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARKLFTTMDVTD NAMDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:772**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:773**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGY TFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVNDPE SGGTFYNQKFDGRVTLTADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGM DYWGQGTTVTVSS
CH CG1 (234,235)MUT, QL, Z NONA	**SEQ ID NO.:774**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSL SLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-1-h10F7-M11.8 YTE DVD	**SEQ ID NO.:775**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYEIHWVRQAPG QGLEWMGVNDPESGGTFYNQKF DGRVTLTADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGM DYWGQGTTVTVSS
HMAK199-1 Vh	**SEQ ID NO.:776**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:777**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:778**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1 (234,235)MUT, YTE,Z NONA	**SEQ ID NO.:779**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLYITREPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-1-h10F7-M10.8 QL DVD	**SEQ ID NO.:780**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFDDYEIHWVRQAPG QGLEWIGVNDPESGGTFYNQKF DGRATLTADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRYDKWDSFYGM DYWGQGTTVTVSS
HMAK199-1 Vh	**SEQ ID NO.:781**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:782**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:783**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFDDYEIHWVRQAPGQG LEWIGVNDPESGGTFYNQKFDG RATLTADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYDKWDSFYGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1 (234,235)MUT, QL, Z NONA	**SEQ ID NO.:784**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD QLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-1-h10F7-M11.8 HC DVD wt	**SEQ ID NO.:785**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYEIHWVRQAPG QGLEWMGVNDPESGGTFYNQKF DGRVTLTADESTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCTRYSKWDSFDGM DYWGQGTTVTVSS
HMAK199-1 Vh	**SEQ ID NO.:786**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFANYGIIWVRQAPGQG LEWMGWINTYTGKPTYAQKFQG RVTMTTDTSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARKLFTTMDVTDNA MDYWGQGTTVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:787**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:788**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:789**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK199-4-h10F7-M11.8 HC DVD wt	**SEQ ID NO.:790**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFNNYGIIWVRQAPGQGLEWM GWINTYTGKPTYAQKFQGRVTMTT DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARKLFNTVAVTDNAMDYWGQGTTV TVSSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYEI HWVRQAPGQGLEWMGVNDPESGGT FYNQKFDGRVTLTADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCTRYSKWDSFD GMDYWGQGTTVTVSS
HMAK199-1 Vh	**SEQ ID NO.:791**	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTFNNYGIIWVRQAPGQGLEWM GWINTYTGKPTYAQKFQGRVTMTT DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARKLFNTVAVTDNAMDYWGQGTTV TVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:792**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:793**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTA DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC TRYSKWDSFDGMDYWGQGTTVTVS S
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:794**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
VARIABLE PESADA DVD HMAK195-21-h10F7-M11.8 HC DVD wt	**SEQ ID NO.:795**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVTWVRQAPGKGLEWVSM IWADGSTHYASSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR YSKWDSFDGMDYWGQGTTVTVSS
HMAK199-1 Vh	**SEQ ID NO.:796**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVTWVRQAPGKGLEWVSM IWADGSTHYASSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSS
ENLAZADOR	**SEQ ID NO.:797**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:798**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGV NDPESGGTFYNQKFDGRVTLTADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRYS KWDSFDGMDYWGQGTTVTVSS
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:799**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
VARIABLE PESADA DVD HMAK195-24-h10F7-M11.8 HC DVD wt	**SEQ ID NO.:800**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGVEWVRQAPGKGLEWVSG IWADGSTHYADTVKSRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWQ HGPVAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG GSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFTDYEIHWVRQAPGQGLEWM GVNDPESGGTFYNQKFDGRVTLTAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR YSKWDSFDGMDYWGQGTTVTVSS

Región de proteína	Identificador de secuencia	12345678901234567890
HMAK199-1 Vh	**SEQ ID NO.:801**	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSNYGVEWVRQAPGKG LEWVSGIWADGSTHYADTVKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAREWQHGPVAYWGQG TLVTVSS
LINKER	**SEQ ID NO.:802**	GGGGSGGGGS
H10F7-M11 Vh	**SEQ ID NO.:803**	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGYTFTDYEIHWVRQAPGQG LEWMGVNDPESGGTFYNQKFDG RVTLTADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCTRYSKWDSFDGMDY WGQGTTVTVSS
CH CG1 Z NONA	**SEQ ID NO.:804**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Combinaciones de cadenas ligeras y pesadas de DVD-IgLa

El siguiente cuadro (cuadro 18) muestra las secuencias de cadenas ligeras y pesadas utilizadas para la expresión de diferentes proteínas de unión DVD-Ig TNF/IL-17.

CUADRO 18. Combinaciones de cadenas ligeras y pesadas de DVD-IgLa

Nombre DVD-Ig	Constructo de cadena pesada	Constructo de cadena ligera
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig	hMAK195-21-GS10-h10F7-M11 HC DVD	hMAK195-21-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig	hMAK195-24-GS10-h10F7-M11 HC DVD	hMAK195-24-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-21-h10F7-M10.8 DVD-Ig	hMAK195-21-GS10-h10F7-M10 HC DVD	hMAK195-21-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-M10.8 DVD-Ig	hMAK195-24-GS10-h10F7-M10 HC DVD	hMAK195-24-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK195-21-h10F7-A6.8 DVD-Ig	hMAK195-21-GS10-h10F7-A6 HC DVD	hMAK195-21-GS10-h10F7-A6 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-A6.8 DVD-Ig	hMAK195-24-GS10-h10F7-A6 HC DVD	hMAK195-24-GS10-h10F7-A6 LC DVD
hMAK195-21-h10F7-A16.8 DVD-Ig	hMAK195-21-GS10-h10F7-A16 HC DVD	hMAK195-21-GS10-h10F7-A6 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-A16.8 DVD-Ig	hMAK195-24-GS10-h10F7-A16 HC DVD	hMAK195-24-GS10-h10F7-A6 LC DVD
hMAK195-21-h10F7-A11.8 DVD-Ig	hMAK195-21-GS10-h10F7-A11 HC DVD	hMAK195-21-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-A11.8 DVD-Ig	hMAK195-24-GS10-h10F7-A11 HC DVD	hMAK195-24-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-21-h10F7-B13.8 DVD-Ig	hMAK195-21-GS10-h10F7-B13 HC DVD	hMAK195-21-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-B13.8 DVD-Ig	hMAK195-24-GS10-h10F7-B13 HC DVD	hMAK195-24-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-21-h10F7-B20.8 DVD-Ig	hMAK195-21-GS10-h10F7-B20 HC DVD	hMAK195-21-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-B20.8 DVD-Ig	hMAK195-24-GS10-h10F7-B20 HC DVD	hMAK195-24-GS10-h10F7-M11 LC DVD
h10F7-M10-hMAk195-21.8 DVD-Ig	h10F7-M10-GS10-MAK195-21HC DVD	h10F7-M10-GS10-MAK195-21 LC DVD
h10F7-M10-hMAk195-24.8 DVD-Ig	h10F7-M10-GS10-MAK195-24HC DVD	h10F7-M10-GS10-MAK195-24 LC DVD
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig	hMAK199-1-GS10-h10F7-M11 HC DVD	hMAK199-1-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK199-1-h10F7-M10.8 DVD-Ig	hMAK199-1-GS10-h10F7-M10 HC DVD	hMAK199-1-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK199-10-h10F7-M11.8 DVD-Ig	hMAK199-10-GS10-h10F7-M11 HC DVD	hMAK199-10-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK199-10-h10F7-M10.8 DVD-Ig	hMAK199-10-GS10-h10F7-M10 HC DVD	hMAK199-10-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK199-6-h10F7-M11.8 DVD-Ig	hMAK199-8-GS10-h10F7-M11 HC DVD	hMAK199-6-GS10-h10F7-M11 LC DVD

Nombre DVD-Ig	**Constructo de cadena pesada**	**Constructo de cadena ligera**
hMAK199-6-h10F7-M10.8 DVD-Ig	hMAK199-6-GS10-h10F7-M10 HC DVD	hMAK199-6-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig	hMAK199-4-GS10-h10F7-M11 HC DVD	hMAK199-4-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	hMAK195-24-SS-h10F7-M11 HC DVD wt	hMAK195-24-SS-h10F7-M11 LC DVD
hMAK199-4-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	hMAK199-4-SS-h10F7-M11 HC DVD wt	hMAK199-4-SS-h10F7-M11 LC DVD
h10F7-M11-hMAk199-4.4 DVD-Ig wt	h10F7-M11-SS-MAK199-4HC DVD wt	h10F7-M11-SS-MAK199-4HC DVD
h10F7-M11-hMAK199-4.8 DVD-Ig wt	h10F7-M11-GS10-MAK199-4HC DVD wt	h10F7-M11-GS10-MAK199-4HC DVD
hMAK199-1-h10F7-M11.8 QL DVD-Ig	hMAK199-1-GS10-h10F7-M11 QL HC DVD	hMAK199-1-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK199-1-h10F7-M11.8 YTE DVD-Ig	hMAK199-1-GS10-h10F7-M11 YTE HC DVD	hMAK199-1-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK199-1-h10F7-M10.8 QL DVD-Ig	hMAK199-1-GS10-h10F7-M10 QL HC DVD	hMAK199-1-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	hMAK199-1-GS10-h10F7-M10 HC DVD wt	hMAK199-1-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	hMAK199-4-GS10-h10F7-M10 HC DVD wt	hMAK199-4-GS10-h10F7-M10 LC DVD
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	hMAK195-21-GS10-h10F7-M11 HC DVD wt	hMAK195-21-GS10-h10F7-M11 LC DVD
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	hMAK195-24-GS10-h10F7-M11 HC DVD wt	hMAK195-24-GS10-h10F7-M11 LC DVD

Caracterización funcional de las proteínas DVD-Ig TNF/IL-17

Protocolo de ensayo inmunosorbente enlazado con enzima IL-17

El siguiente protocolo se utiliza para caracterizar la unión de proteínas DVD-Ig TNF/IL-17 a TNF humano e IL-17 por ensayo inmunosorbente enlazado por enzima (ELISA).

Se recubrió una placa de ELISA con 50 µl por pocillo de IgG-Fc anti ratón de cabra, a 2µg/ml, durante la noche a 4°C.

La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween.

50 µl de Mab diluido a 1µg/ml en PBS/BSA al 0.1% se agregó a los

pocillos adecuados y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT).

La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween. 50 µl de biotina-TNF o IL-17 humanos, diluida en serie se agregó a los pocillos adecuados y se incubó durante 1 hora a RT. La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween.

50 µl de estreptavidina-HRP diluida 1:10.000 en PBS/BSA al 0.1% se agregó a los pocillos adecuados y se incubaron durante 1 hora a RT. La placa se lavó 3 veces con PBS/Tween. 50 µl de TMB se agregaron a los pocillos adecuados y la reacción se dejó continuar durante 1 minuto.

La reacción se detuvo con 50 µl / pocillo de H_2SO_4 2N y se leyó la absorbancia a 450 nm. Los resultados se muestran en el cuadro 19.

CUADRO 19

Unión de proteínas DVD-Ig TNF/IL-17 a TNF humano e IL-17 por ELISA

Nombre DVD-Ig	EC50 en hIL17A ELISA (pM)	EC50 en h TNF ELISA (pM)
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig	95	110
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig	84	200
hMAK195-21-h10F7-M10.8 DVD-Ig	100	90
hMAK195-24-h10F7-M10.8 DVD-Ig	100	200
hMAK195-21-h10F7-A6.8 DVD-Ig	130	13
hMAK195-24-h10F7-A6.8 DVD-Ig	188	12
hMAK195-21-h10F7-A16.8 DVD-Ig	230	34
hMAK195-24-h10F7-A16.8 DVD-Ig	93	66
hMAK195-21-h10F7-A11.8 DVD-Ig	300	300
hMAK195-24-h10F7-A11.8 DVD-Ig	295	295
hMAK195-21-h10F7-B13.8 DVD-Ig	200	373
hMAK195-21-h10F7-B20.8 DVD-Ig	242	300
hMAK199-1-h10F7-M10.8 DVD-Ig	81	220
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig	78	220
hMAK199-10-h10F7-M10.8 DVD-Ig	79	220
hMAK199-10-h10F7-M11.8 DVD-Ig	133	205
hMAK199-6-h10F7-M10.8 DVD-Ig	163	168
hMAK199-6-h10F7-M11.8 DVD-Ig	104	139
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig	130	30
hMAK195-24-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	>500	200
hMAK199-4-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	>500	200
h10F7-M11-hMAk199-4.4 DVD-Ig wt	40	>100
h10F7-M11-hMAK199-4.8 DVD-Ig wt	50	>100
hMAK199-1-h10F7-M11.8 QL DVD-Ig	142	119
hMAK199-1-h10F7-M11.8 YTE DVD-Ig	50	100
hMAK199-1-h10F7-M10.8 QL DVD-Ig	63	183
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	88	95
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	100	61
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	110	95
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	120	141

Medida de afinidad de DVD-Ig anti-TNF/IL-17 por resonancia de plasmón de superficie

La unión de anticuerpos a proteínas TNFα e IL-17 recombinante purificado se determina por mediciones basadas en resonancia de plasmón de superficie con un instrumento de Biacore® T200 (GE Healthcare) usando ejecutar HBS-EP (10 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM de NaCl, 3 mM EDTA, y 0.005% surfactante P20) que contiene 0.1 mg/ml de BSA a 25°C. Todos los químicos se obtienen de Biacore® AB (GE Healthcare) o de otra manera desde un origen distinto, como se describe en el texto. Aproximadamente 5000 RU de anticuerpo policlonal específico de fragmento IgG anti-humano de cabra (Fcγ) (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) diluido en acetato de sodio 10 mM (pH 4.5) se inmoviliza directamente a través de un chip biosensor de grado de investigación CM5 usando un kit de acoplamiento de amina estándar de acuerdo con instrucciones del fabricante y los procedimientos a 25 ug/ml. Radicales que no reaccionan en la superficie del biosensor se bloquean con etanolamina. Superficie de dextrano carboximetilo modificado en celda de flujo 2, 3 y 4 se usan como una superficie de reacción. Dextrano carboximetil modificado con IgG de cabra en celda de flujo 1 se utiliza como la superficie de referencia. Para análisis cinético, ecuaciones de velocidad derivadas del modelo de unión de Langmuir 1:1 se ajustaron simultáneamente a las fases de asociación y disociación de las seis inyecciones (con análisis de ajuste global flotador local para Rmax) con el uso de software v.1.0 de evaluación Biacore T200. Anticuerpos purificados se diluyeron en solución salina regulada de pH con HEPES para captura a través de superficies de reacción específica IgG anti-humano de cabra. Anticuerpos que se capturan como ligando (1-5 µg/ml) se inyectan en matrices de reacción a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto. Se monitorea la fase de asociación por 5 minutos, mientras que la fase de disociación se monitorea por 10-60 minutos para acomodar las velocidades de disociación más lentas. Las constantes de velocidad de asociación y disociación, ka (unidad $M^{-1}s^{-1}$) y kd (unidad s^{-1}) se determinan bajo una velocidad de flujo continuo de 50 µl/minuto. Constantes de velocidad son derivadas por hacer mediciones de unión cinética en seis diferentes concentraciones de antígeno que

varían de 0.78 nM a 100 nM, dependiendo de las especies de IL-17 o TNFα probado. La asociación ka, velocidad de disociación Kd y constante de disociación de equilibrio kd se calculan con el uso del mismo software v.1.0 de evaluación de Biacore T200.

CUADRO 20. Afinidad de proteínas DVD-Ig TNF-IL-17 a IL-7 mediante Biacore

	IL17AA Humano			Cyno IL17AA		
Nombre DVD-Ig	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig	2.42E+05	1.05E-05	4.34E-11	2.48E+05	6.28E-06	2.53E-11
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig	2.51E+05	1.07E-05	4.27E-11	2.59E+05	6.25E-06	2.41E-11
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig	3.29E+05	1.11E-05	3.37E-11	2.99E+05	2.15E-06	7.22E-12
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig	3.23E+05	8.76E-06	2.71E-11	2.99E+05	2.57E-06	8.61E-12
hMAK199-1-h10F7-M11.8 QL DVD-Ig	2.21E+05	<1.00 E-06	<4.52 E-12			
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	3.07E+05	7.90E-06	2.57E-11	2.67E+05	1.18E-06	4.44E-12
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	3.11E+05	3.11E+05	2.59E-11	2.78E+05	3.15E-06	1.13E-11
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	2.39E+05	9.26E-06	3.86E-11	2.03E+05	2.21E-06	1.09E-11
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	2.33E+05	8.48E-06	3.63E-11	2.14E+05	4.29E-06	2.01E-11

CUADRO 21. Afinidad de proteínas DVD-Ig TNF-IL-17 a TNF mediante Biacore

	TNFa Humano			Rhesus TNFa		
Nombre DVD-Ig	k_a	k_d	K_D	k_a	k_d	K_D
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig	6.29 E+06	5.70 E-05	9.06 E-12	5.21 E+06	1.32 E-04	2.54 E-11
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig	5.62 E+06	4.69 E-05	8.36 E-12	4.78 E+06	3.43 E-04	7.16 E-11
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig	4.31 E+06	2.37 E-05	5.50 E-12	2.21 E+06	2.39 E-05	1.08 E-11
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig	5.61 E+06	1.73 E-05	3.08 E-12	2.91 E+06	2.25 E-05	7.72 E-12
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	4.28 E+06	2.40 E-05	5.61 E-12	2.20 E+06	3.03 E-05	1.37 E-11
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	5.80 E+06	1.77 E-05	3.06 E-12	3.05 E+06	2.48 E-05	8.13 E-12
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	5.83 E+06	4.97 E-05	8.52 E-12	4.56 E+06	1.41 E-04	3.10 E-11
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	5.62 E+06	4.86 E-05	8.65 E-12	6.12 E+06	4.60 E-04	7.52 E-11

Potencia de neutralización de TNF de moléculas DVD-Ig TNF/IL-17

Bioensayo L929 para medición de potencia de neutralización TNF

TNF humano Lot. No. 1277249 (1.85 mg/mL) se prepara en Abbott Bioresearch Center (Worcester, Massachusetts, US) y recibido de Biologics Pharmacy. Actinomicina D (catálogo # A1410) se adquiere de Sigma Aldrich y re-suspende de una concentración de muestra de 10 mg/mL de DMSO.

Medios de ensayo: 10% de FBS (Hyclone #SH30070.03), Reactivos Gibco: RPMI 1640 (#21870), 2 mM L-glutamina (#25030), 50 unidades/mL de penicilina/50 µg/mL de estreptomicina (#15140), 0.1 mM aminoácidos no esenciales MEM (#11140) y 5.5 X 10^{-5} M 2-mercaptoetanol (#21985-023).

Las células L929 se hacen crecer a una densidad de semi-confluente y se cosechan usando 0.05% de tripsina (Gibco #25300). Las células se lavan con PBS, se cuentan y re-suspenden en 1E6 células/mL en medios de ensayo que contienen 4 µg/mL de actinomicina D. Las células se siembran en una placa de 96

pozos (Costar #3599) en un volumen de 50 µL y 5E4 células/pozo. Pozos reciben 50 µL de medios de ensayo, que llevan el volumen a 100 µL.

Se prepara una muestra de prueba como sigue. El DVD-Ig™ e IgG control se diluyen a una concentración 4x en medios de ensayo y diluciones 1:3 seriales. TNF se diluye hasta 400 pg/mL huTNF en los medios de ensayo. Muestra de DVD-Ig (200 µL) se añade a TNF (200 µL) en un sistema de dilución 1:2 y se les permite incubar durante 0.5 horas a temperatura ambiente.

Para medir la potencia de neutralización de huTNF de DVD-Ig en este ensayo, la solución DVD-Ig/TNF se añade a las células plateadas en 100 µL para una concentración final de DVD-Ig en 375 nM – 0.019 nM DVD-Ig. La concentración final de TNF es 100 pg/mL. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37°C, 5% de CO_2. Para cuantificar la viabilidad, 100 µL se remueven de los pozos y se añade 10 µL de reactivo WST-1 (Roche cat# 11644807001). Las placas se incuban en condiciones de ensayo durante 3.5 horas, se centrifuga a 500 x g y 75 µL del sobrenadante transferido a una placa de ELISA (Costar cat # 3369). Las placas se leen en OD 420-600 nm en un lector de placas ELISA Spectromax 190. La potencia de neutralización de proteínas de unión DVD-Ig TNF/IL-17 seleccionadas se muestra en el cuadro 22.

CUADRO 22. Potencia in vitro para TNF humano

DVD-Ig	Potencia IC50 (nM)
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig	0.013
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig	0.019
hMAK195-21-h10F7-A6.8 DVD-Ig	0.019
hMAK195-24-h10F7-A6.8 DVD-Ig	0.037
ShMAK195-21-h10F7-A16.8 DVD-Ig	0.034
hMAK195-24-h10F7-A16.8 DVD-Ig	0.044
hMAK199-1-h10F7-M10.8 DVD-Ig	0.037
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig	.031
hMAK199-10-h10F7-M10.8 DVD-Ig	0.031
hMAK199-10-h10F7-M11.8 DVD-Ig	0.031
hMAK199-6-h10F7-M10.8 DVD-Ig	0.009
hMAK199-6-h10F7-M11.8 DVD-Ig	0.009
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig	.023
hMAK195-24-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	0.021
hMAK199-4-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	0.01

DVD-Ig	Potencia IC50 (nM)
h10F7-M11-hMAK199-4.4 DVD-Ig wt	4.195
h10F7-M11-hMAK199-4.8 DVD-Ig wt	> 100 nM
hMAK199-1-h10F7-M11.8 QL DVD-Ig	0.027
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	0.033
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	0.014
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	0.01
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	0.019
h10F7-M10-MAK195-24DVD	2.558

Ensayo para secreción IL-6 inducida con IL-17 humana y cyno en fibroblastos de prepucio humano primario HS27

La línea celular HS27 (ATCC acceso # CRL-1634) segrega IL-6 en respuesta a IL-17. Se inhibe la secreción de IL-6 inducida por IL-17 mediante la neutralización de anticuerpos anti-IL-17 (véase, por ejemplo, J. Immunol., 155:5483-5486 (1995); Cytokine, 9:794-800 (1997)).

Las células HS27 se mantuvieron en medio de ensayo: medio de glucosa alta DMEM (Gibco #11965) con 10% de suero bovino fetal (Gibco #26140), 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, penicilina G (100 U/500 ml) y estreptomicina (100 µg/500 ml). Las células se cultivan en matraces T150 hasta que son 80-90% confluente el día del ensayo. IL-17A humano (R & D Systems, #317-IL/CF), o mono cynomolgous (cyno) IL-17A (generado en Abbott) es reconstituido en PBS estéril sin Ca^{2+} y Mg^{2+} congelado almacenado, recién descongelado para uso y diluido a 240 pM (4X) o 4nM (4X) para IL-17A/F en el medio de ensayo. Se hacen diluciones seriadas de anticuerpos en una placa separada (concentraciones 4X), mezclado con volumen igual de 240 pM (4 X) de huIL-17 o cynoIL-17A o 4 nM (4 X) huIL-17A/F y se incuba a 37°C durante 1 hr. Células HS27 (normalmente aproximadamente 20.000 células en 50 µl de medio de ensayo) se agregan a cada pozo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Costar #3599), seguido por la adición de 50 µl de anticuerpo pre-incubado más IL-17. La concentración final de humanos y cynoIL-17A es 60 pM. La concentración final de IL-17A/F humano es 1 nM. Las células se incuban durante aproximadamente 24 horas en 37°C. Luego se colectan los sobrenadantes de medios. Se mide el nivel de neutralización de IL-17 por determinación de las

cantidades IL-6 usando un kit comercial de Meso Scale Discovery (cat # L411AKB-1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtienen valores de IC50 utilizando logaritmo de anticuerpo frente a ajuste de pendiente variable de cantidad de IL-6.

Ensayo para secreción de IL-6 inducida por IL-17 de línea celular de fibroblasto embriónico de murina (NIH3T3)

La línea de células NIH3T3 murina (ATCC acceso # CRL-1658) segrega IL-6 en respuesta IL-17A de ratón rata o conejo cuando se agrega en la presencia de niveles bajos de TNFα de murina (R & D Systems, Cat #410-MT). La secreción de IL-6 inducida por IL-17 es inhibida por la neutralización de DVD-Ig anti-IL-17.

Las células NIH3T3 se mantienen en medio de ensayo: DMEM (Invitrogen Cat #11965-092) con 10% de suero bovino fetal (Gibco #26140-079), 1% de aminoácidos no esenciales, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, penicilina G (100 U/500 ml) y estreptomicina (100 µg/500 ml). Las células se cultivan en matraces T150 hasta que son 80-90% confluente el día del ensayo. IL17A de rata se reconstituye (Prospec bio, Cat # CYT-542) en PBS estéril, sin Ca^{2+} y Mg^{2+}, con 0.1% de BSA, forma alícuotas y se almacena congelado 100 µg/ml. IL17A de conejo (Abbott, A-1239293.0) se forman alícuotas y se almacenan congelados a 260 µg/mL. TNF-α de murina se reconstituye en .1% de BSA/PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} en una concentración de 10 µg/mL, se forman alícuotas y se almacenan congelados. Anticuerpos de IL-17 recién descongelados se diluyen a 200 µg/ml (4X) en el medio de ensayo. Se realizan diluciones seriadas de anticuerpos en una placa separada (concentraciones 4X), mezclado con igual volumen de 40 ng/ml (4X) de IL-17A de rata o ratón o 100 ng/mL de IL-17A de conejo y se incuba a 37°C durante 1 hora.

Células NIH3T3 (normalmente aproximadamente 400.000 células en 50 µl de medio de ensayo) se agregan a cada pozo de una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Costar #3599), seguido de la adición de 50 µl de DVD-Ig pre-incubada más IL-17. TNF-α Mu en 5.5 ng/ml (10 x) se añade en

11µl de medios a cada pozo. La concentración final de IL-17A es 10 ng/ml para murino y rata y 25 ng/mL para conejo. La concentración final de TNFα mu es 0.55ng/mL. Las células se incuban durante aproximadamente 24 horas a 37°C. Luego se colectaron los sobrenadantes de medios. Se mide el nivel de neutralización de IL-17 por determinación de cantidades de IL-6 en el sobrenadante utilizando un kit comercial de Meso Scala Discovery (cat # K112AKA-4) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtienen los valores IC50 utilizando logaritmo de anticuerpos frente a ajuste de pendiente variable de cantidad de IL-6.

CUADRO 23. Secreción de IL-6 a partir de células de fibroblastos en respuesta a IL-17ª

Nombre DVD-Ig	Humano	Cyno	Ratón	Rata	Conejo
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig	207	30	47	490	219
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig	200	36	33	251	206
hMAK195-21-h10F7-M10.8 DVD-Ig	200	49			
hMAK195-24-h10F7-M10.8 DVD-Ig	200	61			
hMAK195-21-h10F7-A6.8 DVD-Ig	200	76			
hMAK195-24-h10F7-A6.8 DVD-Ig	200	62			
hMAK195-21-h10F7-A16.8 DVD-Ig	200	78			
hMAK195-24-h10F7-A16.8 DVD-Ig	200	81			
hMAK195-21-h10F7-A11.8 DVD-Ig	200	76			
hMAK195-24-h10F7-A11.8 DVD-Ig	200	81			
hMAK195-21-h10F7-B13.8 DVD-Ig	200	58			
hMAK195-21-h10F7-B20.8 DVD-Ig	200	44			
hMAK199-1-h10F7-M10.8 DVD-Ig	145	33			

Nombre DVD-Ig	Humano	Cyno	Ratón	Rata	Conejo
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig	200	29	33	248	211
hMAK199-10-h10F7-M10.8 DVD-Ig	200	26			
hMAK199-10-h10F7-M11.8 DVD-Ig	200	33			
hMAK199-6-h10F7-M10.8 DVD-Ig	200	31			
hMAK199-6-h10F7-M11.8 DVD-Ig	200	32			
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig	100	21	26	217	223
hMAK195-24-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	200	170			
hMAK199-4-h10F7-M11.4 DVD-Ig wt	200	30			
h10F7-M11-hMAk199-4.4 DVD-Ig wt	40	57			
h10F7-M11-hMAK199-4.8 DVD-Ig wt	50	14			
hMAK199-1-h10F7-M11.8 QL DVD-Ig	100	24			
hMAK199-1-h10F7-M11.8 YTE DVD-Ig	100				
hMAK199-1-h10F7-M10.8 QL DVD-Ig	NA				
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	95	25	54	750	311
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	46	24	27	364	159
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	100	39	48	422	180
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	77	33	44	367	209

Eficacia terapéutica de anticuerpos Il-17

Potencia de neutralización de anticuerpos IL-17 en modelo KC inducido por IL-17 agudo

Se evalúan varias proteínas DVD-Ig TNF/IL-17 en el modelo KC inducido por rhIL17. Ratones BALB/cJ hembras se pre-dosifican con anticuerpos intra-peritonealmente (i.p.) y 18 horas más tarde se inyectan i.p. con 3µg de rhIL17 en un volumen de 500µL. Después de 1 hora, los ratones son sacrificados y se evaluaron los niveles de KC por MesoScala. Se determinan los valores ED50 para % de inhibición de KC. Como se muestra en el cuadro 24, las tres proteínas DVD-Ig neutralizan completamente IL-17 y TNF in vivo.

CUADRO 24

ED50 en modelos de desafío de citoquina de ratón

Nombre de DVD-Ig	KC inducido por IL-17
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	65
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	24
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	27

Potencia de neutralización de DVD-Ig TNF/IL-17 en modelo de ratón letalmente inducido con rhTNF/D-galactosamina

También se evalúan los brazos de TNF de las moléculas DVD-Ig TNF/IL17 en el modelo de letalidad inducido por rhTNF/D-galactosamina. Ratones C57BL6/N hembra son pre-dosificados con proteína de unión (i.p.) y 18 horas más tarde se desafían (i.p.) con 0.1 µg de rh TNF y 20 mg de D-galactosamina en 500 µL de 0.9% de cloruro de sodio y se monitorea para sobrevivir más de 48 horas. Se calculan los valores ED50 por porcentaje de supervivencia. Como se muestra en el cuadro 25, tres distintos constructos de DVD-Ig anti-IL-17/TNF se analizan en estos modelos y todos los tres constructos neutralizaron completamente bioactividad inducida por TNF humano e IL-17 humano.

CUADRO 25

ED50 en modelos de desafío de citoquina de ratón

Nombre DVD-Ig	Letalidad inducida por LPS/D-gal
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	0.02
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	0.014
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	0.016

Protocolo bioanalítico PK para estudios PK DVD-Ig TNF/IL17 en rata

Ratas macho Sprague-Dawley se les coloca cánula en la vena yugular que pesan aproximadamente 280 g se administran con una dosis única de DVD-Ig o anticuerpos parentales a 4 mg/kg a través de la cánula de la vena yugular. Se recolectan muestras de sangre (50-100 ul) de la vena de cola durante un período de 28 días en tubos separadores de suero, se dejan coagular a temperatura ambiente durante al menos una hora, y se centrifugan durante 10 min a 4C. Las muestras de suero se congelan a -80°C hasta su análisis.

Muestras de suero se descongelan a temperatura ambiente, se centrifugan durante 10 min a 4°C y concentraciones de DVD-Ig determinadas por un unión de ligando usando sistema Meso Scale Discovery (MSD). Brevemente, placas de estrepatavidina se recubren con antígeno humano biotinilado e incuban durante la noche. Las placas se bloquean y el DVD-Ig que contiene las muestras de suero se diluyen con regulador de pH de ensayo (concentración final de suero 1%), se incuban las placas durante una hora y se detectado utilizando a IgG anti-humana de cabra etiquetada con sulfo-etiqueta. Las concentraciones se calculan con la ayuda de una curva estándar utilizando cuatro ajustes logísticos de parámetro.

Parámetros farmacocinéticos para cada animal se calculan con el software WinNonlin versión 5.2.1 por análisis no compartimental usando ajuste trapezoidal lineal.

CUADRO 26

Propiedades de PK de moléculas DVD-Ig TNF/IL-17

Nombre DVD-Ig	T ½ (Hoy)	Cmax (ug/mL)	Vss (mL/kg)	CL (mg/h/kg)
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig	10.4	153.5	55.5	0.17
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig	12.0	159.4	64.3	0.17
hMAK195-21-h10F7-M10.8 DVD-Ig	7.2	149.6	57.9	0.25
hMAK199-1-h10F7-M10.8 DVD-Ig	9.2	132.4	61.2	0.20
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig	7.8	110.0	64.5	0.24
hMAK199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	11.3	135.8	56.3	0.14
hMAK199-4-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	7.7	125.9	58.9	0.22
hMAK195-21-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	9.3	91.3	87.6	0.28
hMAK195-24-h10F7-M11.8 DVD-Ig wt	11.4	86.4	93.6	0.25

Determinación de la estabilidad de suero DVD-Ig in vitro

Protocolo del ensayo de estabilidad de suero in vitro

Anticuerpos y DVD-Igs son recibidos en concentraciones de 5 mg/mL, etiquetados con Alexa Fluor 488 y purificados usando columnas de centrifugado. La tinta Alexa Fluor 488 tiene un radical de éster tetrafluorrofenilo (TFP) que reacciona eficientemente con aminas primarias de proteínas para formar conjugados de tinta-proteína estables. Las proteínas etiquetadas tienen absorción y emisión de fluorescencia máxima de aproximadamente 494 nm y 519 nm respectivamente. Suero de rata que contiene azida de sodio 1 mM se utiliza para diluir las proteínas etiquetadas a 0.5 mg/mL e incubar a 37ºC por hasta 7 días. Cada muestra se diluye también en PBS como control negativo. Las muestras son analizadas por cromatografía de exclusión de tamaño en los días 0, 1, 4 y 7 utilizando columna de Superose 6. La formación de agregados de proteínas y fragmentos se utiliza para monitorear la estabilidad en el suero de las moléculas. Pendientes se calculan al graficar el porcentaje del área de los agregados de alto peso molecular versus tiempo.

CUADRO 27. Formación de agregados de proteína DVD-Ig como medida de la estabilidad

Nombre DVD-Ig	Pendiente
hMAK199-1-h10F7-M10.8 DVD-Ig	0.16, 0.21
hMAk199-1-h10F7-M11.8 DVD-Ig	0.41
hMAk199-10-h10F7-M10.8 DVD-Ig	0.30
hMAk199-10-h10F7-M11.8 DVD-Ig	0.12

EJEMPLO 4

Generación de proteínas de unión de DVD adicional

Las moléculas de proteína de unión a DVD capaces de unirse dos antígenos se construyen utilizando dos anticuerpos monoclonales de origen, uno contra el antígeno A humano, y el otro contra antígeno B humano, se seleccionan como se describe aquí.

Generación de una proteína de unión a DVD que tiene dos longitudes de enlazador

Se utiliza una región constante que contiene µ1 Fc con mutaciones en 234 y 235 para eliminar funciones efectoras ADCC/CDC. Se generan cuatro constructos de proteína de unión a DVD anti-A/B diferentes: 2 con enlazador corto y 2 con enlazador largo, cada uno en dos orientaciones de dominio diferentes: V_A-V_B-C y V_B-V_A-C. Las secuencias de enlazador, derivadas de la secuencia N-terminal de dominio humano Cl/Ck o CH1, son los siguientes:

Para constructos de DVDAB:

cadena ligera (si anti-A tiene λ): enlazador corto: QPKAAP (SEQ ID NO: 15); enlazador largo: QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16)

cadena ligera (si anti-A tiene κ): enlazador corto: TVAAP (SEQ ID NO: 13); enlazador largo: TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14)

cadena pesada (γ1): enlazador corto: ASTKGP (SEQ ID NO: 21); enlazador largo: ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22)

Para constructos de DVDBA:

cadena ligera (si anti-B tiene λ): enlazador corto: QPKAAP (SEQ ID NO: 15); enlazador largo: QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO: 16)

cadena ligera (si anti-B tiene k): enlazador corto: TVAAP (SEQ ID NO: 13); enlazador largo: TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO: 14)

cadena pesada (γ1): enlazador corto: ASTKGP (SEQ ID NO: 21); enlazador largo: ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO: 22)

Constructos de cadena ligera y pesada se subclonan en el vector de expresión pBOS y se expresan en células COS, seguido de purificación por cromatografía de proteína A. Los materiales purificados son sometidos a análisis de SDS-PAGE y SEC.

El cuadro 28 describe los constructos de cadena pesada y cadena ligera usadas para expresar cada proteína de unión a DVD anti-A/B

CUADRO 28

Constructos de proteína de unión de DVD anti-A/B

Proteína DVD	**Constructo de cadena pesada**	**Constructo de cadena ligera**
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

Incorporación por referencia

La presente descripción se incorpora como referencia en sus técnicas de totalidad bien conocidas en el campo de la biología molecular y suministro de fármaco. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, las técnicas que se describen en las siguientes publicaciones:

Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, NY (1993);

Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X);

Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);

Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);

Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);

Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981;

Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);

Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;

Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5);

Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);

Lu and Weiner eds., CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X);

MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);

Old, R.W. & S.B. Primrose, PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION: AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4);

Sambrook, J. et al. eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY

MANUAL (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6);

SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978;

Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

Los contenidos de todas las referencias citadas (incluyendo las referencias bibliográficas, patentes, solicitudes de patente y sitios Web) que pueden ser citadas a lo largo de esta aplicación son con lo cual incorporadas expresamente para referencia en su totalidad para cualquier fin, como son las referencias citadas en el mismo. La descripción se empleará, a menos que se indique lo contrario, las técnicas convencionales de inmunología, biología molecular y biología celular, que son bien conocidos en la técnica.

Equivalentes

La descripción puede incorporarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o sus características esenciales. Las modalidades anteriores son por lo tanto consideradas ilustrativas en lugar de limitar la descripción en todos los aspectos. Alcance de la descripción así está indicado por las reivindicaciones anexadas en lugar de la descripción anterior, y todos los cambios que vienen dentro del significado e intervalo de la equivalencia de las reivindicaciones y por tanto, pretenden ser incluidos aquí.

REIVINDICACIONES

Se reivindica lo siguiente:

1.- Una proteína de unión que comprende una cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un enlazador con la condición que no sea CH1;

X2 es una región Fc;

(X1)n, donde n es 0 o 1;

(X2)n, donde n es 0 o 1; y

en donde

(a) VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 48-72 u 88-97 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) VD1 y VD2 independientemente comprenden tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 48-72 u 88-97 y la proteína es capaz de unir TNF;

(c) VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 48-72 u 88-97 y VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; o

(d) VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731,

741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 48-72 u 88-97 y VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811.

2. La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque

(a) VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) VD1 y VD2 independientemente comprenden SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(c) VD1 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, y VD2 comprende SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; o

(d) VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72,, y VD1 comprende SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811.

3.- Una proteína de unión que comprende una cadena polipeptídica,

en donde la cadena polipeptídica comprende VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde;

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un enlazador con la condición que no sea CL;

X2 no constituyen una región Fc;

(X1)n, donde n es 0 o 1;

(X2)n, donde n es 0 o 1; y

en donde

(a) VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107, y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) VD1 y VD2 independientemente comprenden tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107, y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(c) VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107, y VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812;

(d) VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812.

4.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque

(a) VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) VD1 y VD2 independientemente comprenden SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;
(c) VD1 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y VD2 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812; o
(d) VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y VD1 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812.

5.- La proteína de conformidad con la reivindicación 1 o 3, caracterizado porque (X1)n es 0 y/o (X2)n es 0.

6.- Una proteína de unión que comprende primera y segunda cadenas polipeptídicas, en donde la primera cadena polipeptídica comprende un primer VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un primer enlazador;

X2 es una región Fc;

(X1)n, donde nes 0 o 1;

(X2)n, donde n es 0 o 1; y

en donde la segunda cadena polipeptídica comprende un segundo VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n,

en donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un segundo enlazador;

X2 no constituye una región Fc;

(X1)n, donde n es 0 o 1

(X2)n, donde n es 0 o 1; y

en donde el primer y segundo enlazador X1 son lo mismo o diferente;

en donde el primer enlazador X1 no es CH1 y/o el segundo enlazador X1 no es CL y en donde

(a) el dominio variable de cadena pesada VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, el dominio variable de cadena ligera VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 independientemente comprenden tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 independientemente comprenden tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(c) el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u

811

; el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812; o

(d) el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera de VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812.

7.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque

(a) el dominio variable de cadena pesada VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, el dominio variable de cadena ligera VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 independientemente

comprenden SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 independientemente comprenden SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(c) el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812; o

(d) el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758,

768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812.

8.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3 o 6, caracterizada porque X1 y/o X2 es cualquiera de SEQ ID NOS 1-29.

9.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque la proteína de unión consta de dos primeras cadenas polipeptídicas y dos segundas cadenas polipeptídicas.

10.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3 o 6, caracterizada porque la región Fc es una región Fc de secuencia variante.

11.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3 o 6, caracterizada porque la región Fc es una región Fc de un IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE o IgD.

12.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque VD1 de la primera cadena polipeptídica y VD1 de la segunda cadena polipeptídica se obtienen de un mismo anticuerpo de origen primero y segundo, respectivamente, o la porción de unión de antígeno.

13.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque VD1 de la primera cadena polipeptídica y VD1 de la segunda cadena polipeptídica son de un anticuerpo de origen diferentes primero y segundo, respectivamente, o porción de unión de antígeno del mismo.

14.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque VD2 de la primera cadena polipeptídica y VD2 de la segunda cadena polipeptídica son de un mismo anticuerpo de origen primero y segundo, respectivamente, o porción de unión de antígeno del mismo.

15.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 6, caracterizada porque VD2 de la primera cadena polipeptídica y VD2 de la segunda cadena polipeptídica son de un anticuerpo de origen diferente primero y segundo, respectivamente, o porción de unión de antígeno del mismo.

16.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 13 o

15, caracterizada porque el primero y segundo anticuerpos de origen unen diferentes epítopes en el antígeno.

17.- La proteína de unión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-16, caracterizada porque el primer anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, une el primer antígeno con una potencia diferente de la potencia con el que el segundo anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, une el segundo antígeno.

18.- La proteína de unión de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12-16, caracterizada porque el primer anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, une el primer antígeno con una afinidad diferente de la afinidad con la que el segundo anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, une el segundo antígeno.

19.- Una proteína de unión capaz de unir dos antígenos, la proteína de unión que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde dos cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un primer enlazador;

X2 es una región Fc; y

en donde dos cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un segundo enlazador;

X2 no comprende una región Fc;

(X1)n, donde n es 0 o 1; y

(X2)n, donde n es 0 o 1;

donde el primero y segundo enlazador X1 son los mismos o diferentes;

en donde el primer enlazador X1 no es CH1 y/o el segundo enlazador X1 no es CL;

en donde

(a) el dominio variable de cadena pesada VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, el dominio variable de la cadena ligera VD1 o VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 independientemente comprenden tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 independientemente comprenden tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(c) el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812; o

(d) el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO:
30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera de VD1 comprende tres CDRs de SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812.

20.- Una proteína de unión capaz de unir dos antígenos, la proteína de unión que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, en donde dos cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena pesada;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena pesada;

C es un dominio constante de cadena pesada;

X1 es un primer enlazador;

X2 es una región Fc;

(X1)n, donde n es 0 o 1;

(X2)n, donde n es 0 o 1; y

en donde dos cadenas polipeptídicas comprenden VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, donde

VD1 es un primer dominio variable de cadena ligera;

VD2 es un segundo dominio variable de cadena ligera;

C es un dominio constante de cadena ligera;

X1 es un segundo enlazador;

X2 no comprende una región Fc;

(X1)n, donde n es 0 o 1;

(X2)n, donde n es 0 o 1; y

en donde el primero y segundo enlazador X1 son los mismos o diferentes;

en donde el primer enlazador X1 no es CH1 y/o el segundo enlazador X1 no es CL

en donde

(a) el dominio variable de cadena pesada VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, el dominio variable de cadena ligera VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 independientemente comprenden SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 independientemente comprenden SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(c) el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera

VD2 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812; o

(d) el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera de VD1 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812.

21.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 19 o 20, caracterizada porque la proteína de unión tiene una constante de velocidad de asociación (K_{asoc}) a los objetivos uno o más de al menos aproximadamente $10^2M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^3M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^4M^{-1}s^{-1}$; por lo menos aproximadamente $10^5M^{-1}s^{-1}$; o por lo menos aproximadamente $10^6M^{-1}s^{-1}$; como es medido por resonancia de plasmón superficial.

22.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 19 o 20, caracterizada porque la proteína de unión tiene una constante de velocidad de disociación (K_{disoc}) a los objetivos uno o más de a lo más aproximadamente $10^{-3}s^{-1}$; a lo más aproximadamente $10^{-4}s^{-1}$; a lo más aproximadamente $10^{-5}s^{-1}$; o a lo más aproximadamente $10^{-6}s^{-1}$, como es medido por resonancia de plasmón superficial.

23.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6,

19 o 20, caracterizada porque la proteína de unión tiene una constante de disociación (K_D) a los objetivos uno o más de a lo más aproximadamente 10^{-7} M; a lo más aproximadamente 10^{-8} M; a lo más aproximadamente 10^{-9} M; a lo más aproximadamente 10^{-10} M; a lo más aproximadamente 10^{-11} M; a lo más aproximadamente 10^{-12} M; o a lo más 10^{-13} M.

24. Un conjugado de proteína de unión compuesto por una proteína de unión de la reivindicación 1, 3, 6, 19 o 20, el conjugado de proteína de unión además comprende un agente, en donde el agente es una molécula de inmuno-adhesión, un agente de imágenes, un agente terapéutico o un agente citotóxico.

25.- El conjugado de proteína de unión de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado porque el agente de imágenes es una radio-etiqueta, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta bio-luminiscente, una etiqueta magnética o biotina.

26.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 19 o 20, caracterizado porque la proteína de unión es una proteína de unión cristalizada.

27. Un ácido nucleico aislado de codificación de una secuencia de aminoácidos de proteína de unión de la reivindicación 1, 3, 6, 19 o 20.

28.- Un vector compuesto por un ácido nucleico aislado de la reivindicación 27.

29.- El vector de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado porque el vector es pcADN, pTT, pTT3, pEFBOS, pBV, pJV, pcDNA3.1 TOPO, pEF6 TOPO, pHybE, pBOS-hCγ1 o pBJ.

30.- Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 28.

31.- La célula huésped de conformidad con la reivindicación 30, caracterizada porque la célula huésped es una célula procariota.

32.- La célula huésped de conformidad con la reivindicación 30, caracterizada porque la célula huésped es una célula eucariota.

33.- La célula huésped de conformidad con la reivindicación 32, caracterizada porque la célula eucariota es una célula protista, célula animal, célula

vegetal, célula de levadura, células de mamífero, célula aviar, célula de insecto o célula fúngica.

34.- Un método de producción de una proteína de unión, que comprende el cultivo de una célula huésped descrita en cualquiera de las reivindicaciones 30-33 en medio de cultivo bajo condiciones suficientes para producir la proteína de unión.

35.- Una proteína producida del método de la reivindicación 34.

36. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de la reivindicación 1, 3, 6, 19, 20, o 35 y un portador farmacéuticamente aceptable.

37.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque comprende al menos un agente terapéutico adicional.

38.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 37, caracterizada porque el agente terapéutico adicional es un agente de imágenes, un agente citotóxico, un inhibidor de angiogénesis, un inhibidor de quinasa, un bloqueador de molécula de co-estimulación, un bloqueador de la molécula de adhesión, un anticuerpo anti-citoquina o un su fragmento funcional, metotrexato, ciclosporina, rapamicina, FK506, una etiqueta detectable o reportero, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriatico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una eritropoyetina, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un medicamento de reemplazo hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, una medicación para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo,, una citoquina o un antagonista de citoquina.

39.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 1, 3, 6, 19, 20 o 35 para el uso en el tratamiento de un sujeto para una enfermedad o un trastorno al administrar al sujeto la proteína de unión de tal forma que se logre el

tratamiento.

40.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 39, caracterizada porque el trastorno son trastornos autoinmunes e inflamatorios, asma, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artropatía espondilitis, psoriasis, trastornos gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Chrohn, uveitis y lupus eritematoso sistémico.

41.- La proteína de unión de conformidad con la reivindicación 40, caracterizada porque la administradora al sujeto es parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelial, intercerebral, intracerebroventricular, intracolica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.

42.- Un método para generar una proteína de unión capaz de unir dos antígenos, el método que comprende los pasos de:

a) obtener un primer anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, capaz de unir un primer antígeno;

b) obtener un segundo anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, capaz de unir un segundo antígeno;

c) construir el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 6, 19 o 20;

d) expresar la o las cadenas polipeptídicas;

tal que se genera una proteína de unión capaz de unir el primer y el segundo antígeno.

43.- El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque

(a) el dominio variable de cadena pesada VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661,

671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, el dominio variable de la cadena ligera VD1 o VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(b) los dominios variables de cadena pesada VD1 y VD2 independientemente comprenden SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72, los dominios variables de cadena ligera VD1 y VD2 independientemente comprenden SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y la proteína de unión es capaz de unir TNF;

(c) el dominio variable de cadena pesada VD1 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72y el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende SEQ ID NO:

30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812;

(d) el dominio variable de cadena pesada VD2 comprende SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807 u 809 o cualquiera de 36-41, 88-97 o 48-72 y el dominio variable de

cadena pesada VD1 comprende SEQ ID NO:
30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 u 811; el dominio variable de cadena ligera VD2 comprende SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 o cualquiera de 42-47, 73-87 o 98-107 y el dominio variable de cadena ligera VD1 comprende SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 31-526, 535-539, 548, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 u 812.

44.- El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque la región Fc es una región Fc de secuencia variante.

45.- El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque la región Fc es una región Fc desde una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE o IgD.

46.- El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el primer anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, si está presente, une el primer antígeno con una afinidad diferente y/o la potencia que la afinidad y/o potencia con la que el segundo anticuerpo de origen o porción de unión de antígeno del mismo, si está presente, une el segundo antígeno.

47.- Un método para determinar la presencia de al menos un antígeno o fragmento del mismo en una muestra de prueba por un inmunoensayo,

en donde el inmunoensayo comprende el contacto con la muestra de prueba con al menos una proteína de unión y por lo menos una etiqueta detectable, en donde la proteína de unión al menos una comprende la proteína de unión de la reivindicación 1, 3, 9, 19, 20 o 35.

48.- El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado porque comprende:
(i) poner en contacto la muestra de prueba con la proteína de unión al menos una, en donde la proteína de unión se une a un epítope en el antígeno o fragmento del mismo con el fin de formar un primer complejo;

(ii) poner en contacto el complejo con la etiqueta detectable al menos una, en donde la etiqueta detectable se une a la proteína de unión o un epítope en el antígeno o fragmento del mismo que no está unido por la proteína de unión para formar un segundo complejo; y

(iii) detectar la presencia del antígeno o fragmento del mismo en la muestra de prueba basada en la señal generada por la etiqueta detectable en el segundo complejo, donde la presencia del antígeno o fragmento del mismo está directamente relacionada con la señal generada por la etiqueta detectable.

49.- El método de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque comprende:

(i) poner en contacto la muestra de prueba con la proteína de unión al menos una, en donde la proteína de unión se une a un epítope en el antígeno o fragmento del mismo con el fin de formar un primer complejo;

(ii) poner en contacto el complejo con la etiqueta detectable al menos una, en donde la etiqueta detectable compite con el antígeno o fragmento del mismo para unirse a la proteína de unión con el fin de formar un segundo complejo; y

(iii) detectar la presencia del antígeno o fragmento del mismo en la muestra de prueba basada en la señal generada por la etiqueta detectable en el segundo complejo, donde la presencia del antígeno o fragmento del mismo indirectamente está correlacionado con la señal generada por la etiqueta detectable.

50.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48-50, caracterizado porque la muestra de prueba es de un paciente y el método además comprende el diagnóstico, pronóstico o valoración de la eficiencia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, y

en donde si el método además comprende evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método opcionalmente comprende además modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia.

51.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48-51, caracterizado porque el método está adaptado para su uso en un sistema automatizado o semiautomatizado.

52.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 48-52, caracterizado porque el método determina la presencia de más de un antígeno en la muestra.

53.- Un método para determinar la cantidad o concentración de un antígeno o su fragmento en una muestra de prueba por un inmunoensayo,

en donde el inmunoensayo (a) emplea al menos una proteína de unión y por lo menos una etiqueta detectable y (b) comprende comparar una señal generada por la etiqueta detectable con un control o calibrador que comprende el antígeno o su fragmento,

en donde el calibrador opcionalmente es parte de una serie de calibradores en donde cada calibrador difiere de los otros calibradores en las series por la concentración del antígeno o su fragmento,

en donde al menos una proteína de unión comprende la proteína de conformidad con la reivindicación 1, 3, 9, 19, 20 o 35.

54.- El método de conformidad con la reivindicación 54, caracterizado porque comprende adicionalmente:

(i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos una proteína de unión, en donde la proteína de unión se une a un epítope en el antígeno o su fragmento con el fin de formar un primer complejo;

(ii) poner en contacto con el complejo con al menos una etiqueta detectable, en donde la etiqueta detectable se une a un epítope en el antígeno o su fragmento que no está unido por la proteína de unión para formar un segundo complejo; y

(iii) determinar la cantidad o concentración del antígeno o su fragmento en la muestra de prueba basado en la señal generada por la etiqueta detectable en el segundo complejo, en donde la cantidad o concentración del antígeno o su fragmento es directamente proporcional a la señal generada por la etiqueta detectable.

55.- El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque comprende adicionalmente:

(i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos una proteína

de unión, en donde la proteína de unión se une a un epítope en el antígeno o su fragmento con el fin de formar un primer complejo;

(ii) poner en contacto el complejo con al menos una etiqueta detectable, en donde la etiqueta detectable compite con el antígeno o su fragmento para unirse a la proteína de unión para formar un segundo complejo; y

(iii) determinar la cantidad o concentración del antígeno o su fragmento en la muestra de prueba basado en la señal generada por la etiqueta detectable en el segundo complejo, en donde presencia del antígeno o su fragmento es indirectamente proporcional a la señal generada por la etiqueta detectable.

56.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-56, caracterizado porque la muestra de prueba es de un paciente y el método además comprende el diagnóstico, pronóstico o evaluación de la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, y

en donde si el método además comprende evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente, el método opcionalmente comprende además modificar el tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente según sea necesario para mejorar la eficacia.

57.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-57, caracterizado porque el método se adapta para uso en un sistema automatizado o sistema semi-automatizado.

58.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54-58, caracterizado porque el método determina la cantidad o concentración de más de un antígeno en la muestra.

59.- Un kit para ensayar una muestra de prueba para la presencia, cantidad o concentración de un antígeno o su fragmento, el kit comprende

(a) instrucciones para ensayar la muestra de prueba para el antígeno o su fragmento y

(b) al menos una proteína de unión que comprende la proteína de unión de la reivindicación 1, 3, 9, 19, 20 o 35.

60.- Una proteína de unión a IL-17 que comprende al menos una

región variable de cadena pesada (región VH) que comprende:

(a) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811; o

(b) cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811.

61.- Una proteína de unión a IL-17 que comprende al menos una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende:

(a) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812; o

(b) cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812.

62.- Una proteína de unión a IL-17 que comprende al menos una región variable de cadena pesada (región VH) y al menos una región variable de cadena ligera (región VL) donde la región VH comprende:

(a) tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811; o

(b) cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811; y

la región VL comprende:

(c) tres CDR de cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812; o

(d) cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812.

63.- La proteína de unión de la reivindicación 62, donde la proteína de unión comprende dos regiones VH y dos regiones VL.

64.- La proteína de unión de la reivindicación 62, donde la proteína de unión comprende al menos una región VH y al menos una región VL que comprende un conjunto de secuencias de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 30 y 31; 32 y 33; 34 y 35; 108 y 118; 108 y 119; 109 y 116; 110 y 117; 111 y 120; 112 y 117; 113 y 120; 114 y 117; 115 y 117; 527 y 537; 527 y 538; 528 y 535; 529 y 536; 530 y 539; 531 y 536; 532 y 539; 533 y 536; y 534 y 536.

65.- La proteína de unión de la reivindicación 63, donde la proteína de unión:

(a) modula una función biológica de IL-17;

(b) neutraliza IL-17;

(c) disminuye la capacidad de IL-17 de unirse a su receptor;

(d) disminuye la capacidad de IL-17 pro-humana, IL-17 humana madura, o IL-17 humana truncada de unirse a su receptor; y/o

(e) reduce uno o más de la producción de citocina dependiente de Il-17, destrucción celular dependiente de IL-17, inflamación dependiente de IL-17, erosión de los huesos dependiente de IL-17 y el daño a los cartílagos dependiente de IL-17.

66.- La proteína de unión de la reivindicación 63, donde la proteína de unión tiene una constante de velocidad de asociación (Kasoc) de al menos alrededor de $10^2M^{-1}s^{-1}$; al menos alrededor de $10^3M^{-1}s^{-1}$; al menos alrededor de

$10^4M^{-1}s^{-1}$; al menos alrededor de $10^5M^{-1}s^{-1}$; o al menos alrededor de $10^6M^{-1}s^{-1}$, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales.

67.- La proteína de unión de la reivindicación 63, donde la proteína tiene una constante de velocidad de disociación (Kdisoc) de como máximo alrededor de $10^{-3}s^{-1}$; como máximo alrededor de $10^{-4}s^{-1}$; como máximo alrededor de 10^{-5}s-1; o como máximo alrededor de $10^{-6}s^{-1}$, según se mide mediante resonancia de plasmones superficiales.

68.- La proteína de unión de la reivindicación 63, donde la proteína de unión tiene una constante de disociación (KD) de como máximo alrededor de 10^{-7} M; como máximo alrededor de 10^{-8} M; como máximo alrededor de 10^{-9} M; como máximo alrededor de 10^{-10} M; como máximo alrededor de 10^{-11} M; como máximo alrededor de 10^{-12} M; o como máximo de 10^{-13} M.

69.- Una proteína de unión capaz de unirse a IL-17 humana, la proteína de unión comprende:

(a) una región constante de cadena pesada;

(b) una región constante de cadena ligera;

(c) una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, y 811; y

(d) una región variable de cadena ligera (región VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, y 812.

70.- La proteína de unión de la reivindicación 62, donde la proteína de unión comprende una molécula de inmunoglobulina, un Fv, un Fv enlazado a disulfuro, un anticuerpo monoclonal, un scFv, una proteína de unión quimérica, una proteína de unión de dominio simple, una proteína de unión injertada en una CDR, un diacuerpo, una proteína de unión humanizada, una proteína de unión

multiespecífica, un Fab, una proteína de unión específica dual , un fragmento Fab', una proteína de unióna biespecífica, un fragmento F(ab')2, una DVD-Ig™, un gragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos a un puente disulfuro en la región bisagra, un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, un fragmento dAb, una regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aislada, o una proteína de unión de cadena simple.

71.- La proteína de unión de la reivindicación 63, donde la proteína de unión está conjugada con un agente de imaginología seleccionado del grupo que consiste en una radioetiqueta, una enzima, una etiqueta fluorescente, una etiqueta luminiscente, una etiqueta bioluminiscente, una etiqueta magnética y biotina.

72.- La proteína de unión de la reivindicación 63, donde la proteína de unión comprende adicionalmente un agente terapéutico o citotóxico seleccionado del grupo que consiste en un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiangiogénico, un agente antimicótico, una antraciclina, toxina y un agente apoptótico.

73.- Un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la reivindicación 62.

74.- Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 73.

75.- Una célula hospedadora que comprende un vector de la reivindicación 74.

76.- Un método para producir una proteína que se une a IL-17, el método comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 75 en un medio de cultivo, bajo condiciones suficientes para producir una proteína de unión que se una a IL-17.

77.- Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de la reivindicación 62, y un portador farmacéuticamente aceptable.

78.- Un método para tratar a un mamífero que comprende administrarle al mamífero una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la

reivindicación 77.

79.- Un método para reducir la actividad de IL-17 humana, el método comprende poner en contacto IL-17 humana con la proteína de unión de la reivindicación 62, de manera que la actividad de IL-17 se reduzca.

80.- El método para reducir la actividad de IL-17 en un sujeto humano que padece de un trastorno en el cual la actividad de IL-17 es perjudicial, el método comprende administrarle al sujeto humano la proteína de unión de la reivindicación 62, de manera que la actividad de IL-17 humano en el sujeto humano se reduzca y/o se logre el tratamiento.

81.- Un método para tratar a un paciente que padece de un trastorno en el cual IL-17 es perjudicial, que comprende administrarle al paciente la proteína de unión de la reivindicación 62 ya sea antes, a la vez, o después de la administración al paciente de un segundo agente, donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en budenosida, factor de crecimiento epidérmico, corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina, aminosalicilatos, 6-mercaptopurina, azatioprina, metronidazol, inhibidores de lipoxigenasa, mesalamina, olsalazina, balsalazida, antioxidantes, inhibidores de tromboxano, antagonistas del receptor de IL-1, mAbs anti-IL-1□, receptores de mAbs anti-IL-6 o IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa, compuestos de piridinil-imidazol, anticuerpos o antagonistas de TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-23, EMAP-II, GM-CSF, FGF, y PDGF, anticuerpos de CD2, CD3, CD4, CD8, CD-19, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD90 o sus ligandos, metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetilo, leflunomida, AINE, ibuprofeno, corticosteroides, prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores del complemento, agentes adrenérgicos, inhibidores de cinasa MAP, IRAK, NIK, IKK, p38, inhibidores de la enzima que convierte IL-1□, inhibidores de la enzima que convierte TNF□, inhibidores de la señalización de linfocitos T, inhibidores de metaloproteinasa, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima que convierte angiotensina, receptores de citocinas solubles, receptor de p55 TNF soluble, receptor de p75 TNF soluble, sIL-1RI, sIL-1RII, sIL-6R, citocinas

antiinflammatorias, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, y TGF□

82.- El método de la reivindicación 80 u 81, donde el trastorno es un trastorno autoinmunitario y/o inflamatorio.

83.- El método de la reivindicación 82, donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en trastornos autoinmunitarios y antiinflamatorios, asma, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artropatía espondilitis, psoriasis, trastornos gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Chrohn, uveitis, y lupus eritematoso sistémico.

84.- El método de la reivindicación 82, donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, inflamación, enfermedad de Crohn, psoriasis (incluyendo psoriasis en placa), artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis psoriásica, osteoartritis, o artritis idiopática juvenil), esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, artropatía espondilitis, lupus eritematoso sistémico, uveitis, esclerósis múltiple, sepsis, enfermedades neurodegenerativas, regeneración neuronal, lesiones a la médula espinal, cánceres primarios y metastásicos, un trastorno respiratorio; asma; asma alérgico o no alérgico; asma debido a una infección; asma debido a una infección con el virus sincitial respiratorio (RSV); enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); una afección que involucra la inflamación de las vías respiratorias; eosinofilia; fibrosis y producción excesiva de mucosa; fibrosis quística; fibrosis pulmonar; un trastorno atópico; dermatitis atópica; urticaria; eczema; rinitis alérgica; enterogastritis alérgica; una afección inflamatoria y/o autoinmunitaria de la piel; una afección inflamatoria y/o autoinmunitaria de los órganos gastrointestinales; enfermedad inflamatoria intestinal (IBD); colitis ulcerosa ; una afección inflamatoria y/o autoinmunitaria del hígado; cirrósis hepática; liver fibrosis; fibrosis hepática causada por el virus de la hepatitis B y/o C virus; escleroderma; tumores o cánceres; carcinoma hepatocelular; glioblastoma; linfoma; linfoma de Hodgkin; una infección viral; una infección bacteriana; una infección parasitaria; una infección por HTLV-1; supresión de la expresión de las respuestas inmunitarias protectoras tipo 1, y supresión de la expresión de una

respuesta inmunitaria protectora tipo 1 durante la vacunación.

85.- Un método para determinar la presencia de IL-17 o un fragmento de esta en una muestra de prueba mediante inmunoensayo, donde el inmunoensayo comprende poner en contacto la muestra de prueba con al menos una proteína de unión o un fragmento de esta, de acuerdo con la reivindicación 62, y al menos una etiqueta detectable.

86.- El método de la reivindicación 85, donde el método comprende adicionalmente:

(i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos una proteína de unión o un fragmento de esta, donde la proteína de unión se une a un epítopo de IL-17 o un fragmento de este, de manera de formar un primer complejo;

(ii) poner en contacto el complejo con al menos una etiqueta detectable, donde la etiqueta detectable se une a un epítopo en el primer complejo, o en IL-17 o fragmento de este, que no está unido a la proteína de unión o fragmento de esta, para formar un segundo complejo; y

(iii) detectar la presencia de IL-17 o fragmento de esta en la muestra de prueba, basándose en la señal generada por la etiqueta detectable en el segundo complejo, donde la presencia de Il-17 o un fragmento de esta se relaciona directamente con la señal generada por la etiqueta detectable.

87.- El método de la reivindicación 85, donde el método comprende adicionalmente:

(i) poner en contacto la muestra de prueba con al menos una proteína de unión o un fragmento de esta, donde la proteína de unión o fragmento de esta se une a un epítopo de IL-17 o un fragmento de este, de manera de formar un primer complejo;

(ii) poner en contacto el complejo con al menos una etiqueta detectable, donde la etiqueta detectable compite con IL-17 o fragmento de este, para unirse a la proteína de unión o fragmento de esta, de manera de formar un segundo complejo; y

(iii) detectar la presencia de IL-17 o fragmento de esta en la muestra de prueba, basándose en la señal generada por la etiqueta detectable en el

segundo complejo, donde la presencia de Il-17 o un fragmento de esta se relaciona indirectamente con la señal generada por la etiqueta detectable.

88.- El método de la reivindicación 85, donde el método comprende adicional y opcionalmente realizar un diagnóstico, pronóstico, o evaluar la eficacia del tratamiento terapéutico/profiláctico del paciente.

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

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 22-05-14 (30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** 61/550,619 (32) ***Fecha*** 24-10-11 (33) ***País*** US	(51) Int Cl: **C07K 16/24** (71) Solicitante(s): **ABBVIE INC.** (72) Inventor(es): HSIEH, Chung-Ming; PEREZ, Jennifer; BENATUIL, Lorenzo; KUTSKOVA, Yuliya; MEMMOTT, John; ZHONG, Suju; EATON, Lucia; HUGUNIN, Margaret; BRITO, Alyssa y CLABBERS, Anca. (74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 24-05-14 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 24-10-12 No. de solicitud: ***PCT/US2012/061686***	(87) Publicación internacional Fecha: ***02-05-13*** No. publicación: ***WO 2013/063110 A1***
(54) Titulo: **"INMUNOLIGANTES BIESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA TNF E IL-17"**	

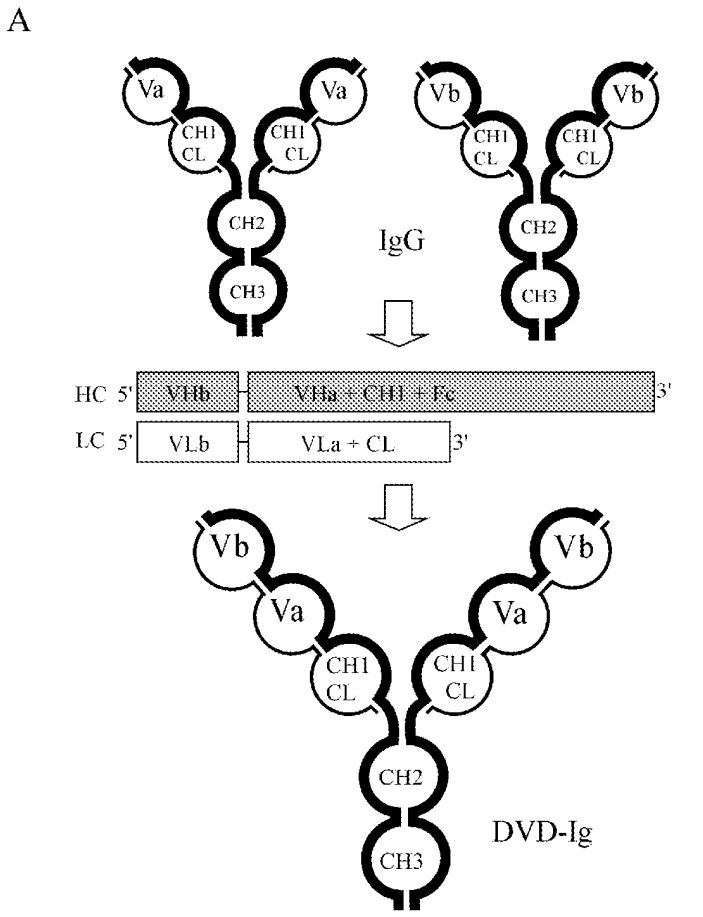
Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Se proporcionan proteínas de unión multiespecíficas y multivalentes diseñadas, métodos de fabricación, y específicamente sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad.

Sector: Sector Biotecnológico. Proteínas de unión multi-específicas y multivalentes que unen TNF e IL-17, útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, cáncer, entre otras.

Figura 1


A
Va
Vb
CH1
CL
CH2
CH3
IgG
HC 5'
VHb
VHa + CH1 + Fc
3'
LC 5'
VLb
VLa + CL
3'
DVD-Ig
B
DVD1-Ig
DVD2-Ig
α
β
L
VHα
VHβ
CH1+Fc (hC γ1)
VLα
VLβ
hCκ

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
KUTSKOVA, Yuliya
183 Whitney Street
Northborough, MA 01532
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Tholle Peter
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
BENATUIL, Lorenzo
33 Mohawk Drive
Northborough, MA 01532
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Tholle Peter
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

MEMMOTT, John
10 Cody Road
Framingham, MA 01701
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer

Tholle Peter

e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
HUGUNIN, Margaret
7 Indian Path
North Grafton, MA 01536
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Tholle Peter
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
BRITO, Alyssa
35 Carter Street
Hudson, MA 01749
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Tholle Peter
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
HSIEH, Chung-Ming
22 Olde Field Road
Newton, MA 02459
United States of America

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 2 has been added as inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Tholle Peter
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
CUFF, Carolyn
GRINNEL, Christine
TARSCA, Edit
FORKAS, Dora
MATHIEU, Suzanne

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The persons identified in Box 1 have been deleted from the records.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Tholle Peter
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

VELEMA, James, H.
Lathrop & Gage LLP
28 State Street
Suite 0700
Boston, MA 02109-1701
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
23 April 2014 (23.04.2014)

Applicant's or agent's file reference
532372BBI-390PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2012/061686

International filing date *(day/month/year)*
24 October 2012 (24.10.2012)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

HSIEH, Chung-Ming
PEREZ, Jennifer
BENATUIL, Lorenzo
KUTSKOVA, Yuliya
MEMMOTT, John
ZHONG, Suju
EATON, Lucia
HUGUNIN, Margaret
BRITO, Alyssa
CLABBERS, Anca

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The order of the inventors has been changed as shown in Box 2.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Authorized officer
Tholle Peter
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

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/US2012/061686	24.10.2012	24.10.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/24 C07K16/46 A61K39/395

Applicant
ABBVIE INC.

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 and 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") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed 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 3 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.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	see form PCT/ISA/210	Luyten, Kattie Telephone No. +31 70 340-8924

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

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

      ☐ on paper

      ☒ in electronic form

   b. (time)

      ☐ in the international application as filed

      ☐ together with the international application in electronic form

      ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search

4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing 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.

5. Additional comments:

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. 3, 4, 60-88(completely); 1, 2, 5-59(partially)

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☐ 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 whole application or for said claims Nos. 3, 4, 60-88(completely); 1, 2, 5-59(partially)

☐ 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 Searching 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 Searching 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).

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:

   ☐ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

   see separate sheet

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts.

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1, 2, 5-59(all partially)

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	1, 2, 5-59(all partially)
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1, 2, 5-59(all partially)
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1, 2, 5-59(all partially)
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

   see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Prior art

1 Reference is made to the following documents:

D1 US 2010/266531 A1 (HSIEH CHUNG-MING [US] ET AL) 21 October 2010 (2010-10-21)

D2 US 2009/311253 A1 (GHAYUR TARIQ [US] ET AL) 17 December 2009 (2009-12-17)

D3 US 2011/250130 A1 (BENATUIL LORENZO [US] ET AL) 13 October 2011 (2011-10-13)

1.1 Document D1 discloses dual variable domain binding proteins (DVD-Ig) comprising two variable regions of an anti-TNFalpha antibody and two variable regions of an anti-IL-17 antibody according to the same structural format as the present dual variable domain binding proteins, and characterizes their affinity, neutralization potency and pharmacokinetic properties (whole document, especially paragraphs [0291-0330]; Example 3; Tables 38-39, 41-43). Moreover, D1 discloses the human and humanized neutralizing anti-IL-17 antibodies of which the variable domains have been used to make the DVD-Ig (Examples 1-2). The anti-TNF variable domains are those of anti-TNF antibody D2E7 (paragraph [1092]).

1.2 Document D2 discloses several DVD-Ig constructs including anti-TNF x anti-IL-17 DVD-Igs DVD051 and DVD052 (Example 1; Tables 2, 4, 8, 13, 14, 21).

1.3 Document D3 discloses humanized anti-TNFalpha antibodies, including affinity matured versions of hMAK195 (whole document, especially Example 1.1 to 1.7; SEQ ID NO: 31; Table 6). Document D3 has been cited because it discloses the VH region with the closest sequence identity to present SEQ ID NO: 541, and refers to DVD binding proteins capable of binding TNFalpha and a second target (paragraphs [0057-0058]). Therefore, it might become relevant for assessing inventive step.

Item IV

1 This Authority considers that the application lacks unity within the meaning of Rule 13.1 PCT, for the following reasons.

1.1 The present application discloses human and humanized anti-TNF antibodies, humanized anti-IL-17 antibodies and bispecific anti-TNF x anti-IL-17 dual variable domain binding proteins.

1.2 Claims 1-59 relate to the dual variable domain binding proteins and claims 60-88 relate to the anti-IL-17 antibodies.

1.3 Documents D1 and D2 disclose bispecific anti-TNF x anti-IL-17 dual variable domain binding proteins and anti-IL-17 antibodies. D1, furthermore, discloses anti-IL-17 antibodies.

1.4 Although certain specific constructs might have improved properties over the constructs of D1 and D2, overall the present antibodies and DVD-Igs do not have a common particular effect over those disclosed in D1 and D2. Therefore, the technical problems to be solved by the present application are regarded as to provide a further anti-TNF x anti-IL-17 dual variable domain binding protein or a further anti-IL-17 antibody.

1.5 The proposed solutions are:

1: Claims 1-2 and 5-59 (all partially):

A binding protein comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;

VD1 is a first heavy chain variable domain;

VD2 is a second heavy chain variable domain;

C is a heavy chain constant domain;

X is a linker with the proviso that it is not CH1;

X2 is an Fc region;

(X1)n, wherein n is 0 or 1;

(X2)n, wherein n is 0 or 1; and
wherein

(a) VD1 or VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541, and the binding protein is capable of binding TNF;

(b) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541 and VD2 independently comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, or 809,

or any one of 36-41, 48-72, or 88-97, and the binding protein is capable of binding TNF;

(c) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541 and VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 or 811; or

(d) VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541 and VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 or 811.

Corresponding products and methods.

2-76: Claims 1-2 and 5-59 (all partially):

The binding protein as defined for group 1, though wherein the underlined SEQ ID NO is replaced by one of 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, 809, 36-41, 48-72, or 88-97, respectively. Corresponding products and methods.

77: Claims 3-59 (all partially):

A binding protein comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;

VD1 is a first light chain variable domain;

VD2 is a second light chain variable domain;

C is a light chain constant domain;

X1 is a linker with the proviso that it is not CL;

X2 does not comprise an Fc region;

(X1)n, wherein n is 0 or 1;

(X2)n, wherein n is 0 or 1; and
wherein

(a) VD1 or VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546, and the binding protein is capable of binding TNF;

(b) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546 and VD2 independently comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 or any one of 42-47, 73-87, or 98-107, and the binding protein is capable of binding TNF;

(c) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546, and VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 or 812;

(d) VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO:546, and VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 or 812.

Corresponding products and methods.

78-124: Claims 3-59 (all partially):

The binding protein as defined for group 77, though wherein the underlined SEQ ID NO is replaced by one of 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768, 42-47, 73-87, or 98-107, respectively. Corresponding products and methods.

125-366: Claims 60 and 62-88 (all partially):

An IL-17 binding protein comprising at least one heavy chain variable region (VH region) comprising:

(a) three complementarity determining regions (CDRs) from any one of SEQ ID NOS: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, and 811; or

(b) any one of SEQ ID NOS: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 and 811.

Wherein each SEQ ID NO corresponds to one "invention".

Corresponding products and methods.

367-608: Claims 61-88 (all partially):

An IL-17 binding protein comprising at least one light chain variable region (VL region) comprising:

(a) three complementarity determining regions (CDRs) from any one of SEQ ID NOS: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, and 812; or

(b) any one of SEQ ID NOS: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, and 812.

Wherein each SEQ ID NO corresponds to one "invention".

Corresponding products and methods.

1.6 The group of solutions 1-124 and the group of solutions 125-608 have as common concept a "binding protein". Binding proteins, for example, antibodies are generally known in the prior art. Therefore, solutions 1-124 and 125-608 are not linked by a single general inventive concept.

1.7 Solutions 1-124 relate to dual variable domain binding proteins binding TNF and/or IL-17. However, documents D1 and D2 already disclose dual variable domain binding proteins that bind TNF and IL-17. Hence, the concept linking solutions 1-124 is not novel and cannot be considered as a single general inventive concept.

1.8 The single general concept which can be identified as linking solutions 125-608 is an "IL-17 binding protein". However, document D1 already discloses anti-IL-17 binding proteins. Hence, the linking concept is not novel and cannot be considered as the single general inventive concept.

1.9 The different entities listed above, or subgroups thereof, do not have a special technical feature in common, because within the groups of anti-TNF or anti-IL-17 VH and VL sequences there is a large sequence variation, only for part of the DVD-Igs functional properties have been characterized, and these specific constructs show considerable variation in their functional properties, for example affinity. Only a few of the anti-IL-17 the been functionally characterized (affinity), though these do not show any common property that could be considered as a special technical feature. Thus, the subject - matter

of the claims is not so linked as to form a single inventive concept and defines 608 different "inventions". Therefore, the application, does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 and 13.2 PCT.

Item V

1 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

1.1 The prior art does not disclose the sequence of SEQ ID NO: 541 nor a variable region comprising the three CDRs of SEQ ID NO: 541. Hence, as far as the claims relate to SEQ ID NO: 541, they are novel over the cited prior art.

2 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

2.1 Document D1, disclosing dual variable binding domains binding TNF and IL-17, is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1-2 and 5-59.

2.2 Claim 1 differs from document D1 with respect to the sequence of the VH region. Claim 1 defines the binding protein by means of the three CDRs of one of the VH regions. Though, this definition is insufficient to define the antigen specificities or other functional properties. Hence, there is no particular effect associated with this difference. The description discloses seven anti-TNF x anti-IL-17 DVD-Igs comprising a VH with the sequence of SEQ ID NO: 541, see Table 18, which to some extend have been functionally characterized. However, upon comparison of present Tables 21, 22 and 26 with Tables 39, 38 and 41, respectively, of D1, no surprising functional property could be attributed to said seven DVD-Igs comprising SEQ ID NO: 541. Therefore, the problem to be solved by the present application ("invention" 1) may be regarded as to provide a further anti-TNF x anti-IL-17 dual variable domain binding protein.

2.3 Since the properties of the specific SEQ ID NO: 541-based constructs are similar to those of D1, no inventive step can be acknowledged for said constructs or any generalizations thereof, because the provision of further dual variable domain binding proteins with the same antigen specificities and functional properties as those of the prior art, falls within the skills of the skilled person.

2.4 Moreover, present claims 1 and 6, define partial structural features of the VH and/or VL regions of either one or both VH/VL pairs. Though, said partial structural features are insufficient to define both antigen specificities or any other particular function. Therefore, said claims do not solve the problem of providing an anti-TNF x anti-IL-17 dual variable domain binding protein, but provide mere arbitrary dual variable domain "binding" proteins. Hence, said claims do not involve an inventive step.

2.5 Claims 2, 5 and 7-59 do not appear to contain any additional features which in combination with the features of the claims they refer to involve an inventive step as the relevant subject matter is either disclosed in the cited prior art or falls within the knowledge and ability of the skilled person.

2.6 Thus, the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-2 and 5-59 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

Item VIII

1 CLARITY AND SUPPORT (Art. 6 PCT)

1.1 The antigen specificity of an antibody is defined by the combination of its three VH and three VL CDRs. The affinity of an antibody is defined by the combination of its full VH and VL sequences. Therefore, to define any particular antigen or epitope specificities of the present dual variable domain binding proteins, the six CDRs defining the first specificity and the six CDRs defining the second specificity are essential. Moreover, to define any particular affinity or neutralization potency, the full VH and VL of both variable regions are essential. However, the present claims define only part of said structural features. Therefore, the present claims lack essential features in order to define the antigen and epitope specificity and the affinity and neutralization potency of the exemplified dual variable domain binding proteins.

1.2 Claim 35 is formulated as a "product by process" claim. Though, process steps do not allow to define the technical features of a product. Hence, a product is not limited by the process by which it has been made. Therefore, this formulation raises doubt with respect to the technical features of the protein produced. Moreover, claim 35 indirectly refers back to the proteins of claims 1, 6, 19 and 20. This raises doubt with respect to the extend of the scope of claim 35 compared to said claims and renders claim 35 unclear.

1.3 It is noted that the expression "optionally" as used in claims 50, 53 and 56 does not have a limiting effect on the scope of the claim. Embodiments defined as optional are ignored when assessing novelty and inventive step.

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **ANA MARIA CASTRO WEY** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. No. 53.215

Los abajo firmantes,

AbbVie Inc., una compañía organizada y existente bajo las leyes de Delaware

con domicilio en

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, Estados Unidos.

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

The undersign,

AbbVie Inc., a company organized and existing under the laws of Delaware

domiciled at

1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, U.S.A

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Dado y firmado/ Given and signed this

1/22/2014

William J. Chase

Executive Vice President, and Chief Financial Officer

AbbVie Inc.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
2 May 2013 (02.05.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/063110 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/061686

(22) International Filing Date:
24 October 2012 (24.10.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/550,619 24 October 2011 (24.10.2011) US

(71) Applicant: **ABBVIE INC.** [US/US]; 1 North Waukegan Road, North Chicago, IL 60064 (US).

(72) Inventors; and
(71) Applicants : **CUFF, Carolyn** [US/US]; 25 Adams Road, Grafton, MA 01519 (US). **PEREZ, Jennifer** [US/US]; 135 Longmeadow Avenue, Worcester, MA 01506 (US). **ZHONG, Suju** [US/US]; 10 Westport Drive, Shrewsbury, MA 01545 (US). **EATON, Lucia** [US/US]; 177 Magill Drive, Grafton, MA 01519 (US). **CLABBERS, Anca** [US/US]; 20 Haven Hill Road, Rutland, MA 01543 (US). **GRINNEL, Christine** [US/US]; 60 Scenic Drive, Holden, MA 01520 (US). **TARSCA, Edit** [US/US]; 1 Robin Circle, Westborough, MA 01581 (US). **FORKAS, Dora** [US/US]; 4 Spring Street, Lexington, MA 02421 (US). **MATHIEU, Suzanne** [US/US]; 49 Nottingham Drive, Jefferson, MA 01522 (US).

(74) Agents: **VELEMA, James, H.** et al.; Lathrop & Gage LLP, 28 State Street, Suite 0700, Boston, MA 02109-1701 (US).

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

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

WO 2013/063110 A1

(54) **Title**: BISPECIFIC IMMUNOBINDERS DIRECTED AGAINST TNF AND IL-17

(57) **Abstract**: Engineered multivalent and multispecitic binding proteins, methods of making, and specifically their uses in the prevention, diagnosis, and/ or treatment of disease are provided.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

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.
532372BBI-390PC		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2012/061686	24/10/2012	24/10/2011
Applicant		
ABBVIE INC.		

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 9 sheets.

☐ 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
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   ☒ 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,**
   ☐ the text is approved as submitted by the applicant
   ☒ the text has been established, according to Rule 38.2, 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. _____
      ☐ 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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/061686

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c 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. (means)

   [ ] on paper

   [X] in electronic form

   b. (time)

   [ ] in the international application as filed

   [ ] together with the international application in electronic form

   [X] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] 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:

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

Abstract of the Disclosure
Engineered multivalent and multispecitic binding proteins, methods of making, and specifically their uses in the prevention, diagnosis, and/or treatment of disease are provided.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/061686

Box No. 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. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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 No. 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:

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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.:

1, 2, 5-59(all partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/061686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/24 C07K16/46 A61K39/395
ADD.

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 practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/266531 A1 (HSIEH CHUNG-MING [US] ET AL) 21 October 2010 (2010-10-21) whole document, especially paragraphs [0291-0330, 1092]; Examples 1-3; Tables 38-39, 41-43	1,2,5-59
X	US 2009/311253 A1 (GHAYUR TARIQ [US] ET AL) 17 December 2009 (2009-12-17) Example 1; Tables 2, 4, 8, 13, 14, 21	1,2,5-59
X	US 2011/250130 A1 (BENATUIL LORENZO [US] ET AL) 13 October 2011 (2011-10-13) whole document, especially Example 1.1 to 1.7; SEQ ID NO: 31; Table 6	1,2,5-59

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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 application or patent 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
18 January 2013	15/03/2013

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, Fax: (+31-70) 340-3016	Luyten, Kattie

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2012/061686

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010266531 A1	21-10-2010	AR 075798 A1	27-04-2011
		AU 2010221166 A1	08-09-2011
		CA 2752648 A1	10-09-2010
		CN 102781470 A	14-11-2012
		CO 6410314 A2	30-03-2012
		DO P2011000274 A	31-10-2011
		EP 2403531 A2	11-01-2012
		JP 2012519708 A	30-08-2012
		KR 20110128909 A	30-11-2011
		PE 10942012 A1	13-09-2012
		SG 173705 A1	29-09-2011
		TW 201043241 A	16-12-2010
		US 2010266531 A1	21-10-2010
		UY 32477 A	30-06-2010
		WO 2010102251 A2	10-09-2010
US 2009311253 A1	17-12-2009	AR 072001 A1	28-07-2010
		AU 2009256250 A1	10-12-2009
		CA 2726087 A1	10-12-2009
		CN 102112495 A	29-06-2011
		CO 6331347 A2	20-10-2011
		DO P2010000368 A	15-02-2011
		EC SP10010644 A	28-02-2011
		EP 2297209 A2	23-03-2011
		JP 2011523853 A	25-08-2011
		KR 20110016958 A	18-02-2011
		NZ 589434 A	30-11-2012
		PE 00922010 A1	12-03-2010
		RU 2010153580 A	20-07-2012
		TW 201008580 A	01-03-2010
		US 2009311253 A1	17-12-2009
		UY 31862 A	05-01-2010
		WO 2009149189 A2	10-12-2009
US 2011250130 A1	13-10-2011	AR 080840 A1	09-05-2012
		AU 2011237679 A1	01-11-2012
		CA 2795734 A1	13-10-2011
		EP 2555797 A1	13-02-2013
		SG 184473 A1	29-11-2012
		TW 201138825 A	16-11-2011
		US 2011250130 A1	13-10-2011
		UY 33319 A	01-12-2011
		WO 2011127141 A1	13-10-2011

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 2, 5-59(all partially)

A binding protein comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein;
VD1 is a first heavy chain variable domain;
VD2 is a second heavy chain variable domain;
C is a heavy chain constant domain;
X is a linker with the proviso that it is not CH1;
X2 is an Fc region;
(X1)n, wherein n is 0 or 1;
(X2)n, wherein n is 0 or 1; and
wherein
(a) VD1 or VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541 , and the binding protein is capable of binding TNF;
(b) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541 and VD2 independently comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541, 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, or 809, or any one of 36-41, 48-72, or 88-97, and the binding protein is capable of binding TNF;
(c) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541 and VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 or 811; or
(d) VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 541 and VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 30, 32, 34, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 or 811.
Corresponding products and methods.

2-76. claims: 1, 2, 5-59(all partially)

The binding protein as defined for group 1, though wherein the underlined SEQ ID NO is replaced by one of 551, 561, 571, 581, 591, 601, 606, 611, 616, 621, 626, 631, 636, 643, 653, 661, 671, 681, 691, 701, 711, 721, 731, 741, 753, 763, 771, 776, 781, 786, 791, 796, 801, 805, 807, 809, 36-41, 48-72, or 88-97, respectively. Corresponding products and methods.

---

77. claims: 3-59(partially)

A binding protein comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n,

wherein;
VD1 is a first light chain variable domain;
VD2 is a second light chain variable domain;
C is a light chain constant domain;
X1 is a linker with the proviso that it is not CL;
X2 does not comprise an Fc region;
(X1)n, wherein n is 0 or 1;
(X2)n, wherein n is 0 or 1; and
wherein
(a) VD1 or VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546 , and the binding protein is capable of binding TNF;
(b) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546 and VD2 independently comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546, 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768 or any one of 42-47, 73-87, or 98-107, and the binding protein is capable of binding TNF;
(c) VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546 , and VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 or 812;
(d) VD2 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 546 , and VD1 comprises three CDRs from SEQ ID NO: 31, 33, 35, 116, 117, 118, 119, 120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766 or 812.
Corresponding products and methods.

78-124. claims: 3-59(partially)

The binding protein as defined for group 77, though wherein the underlined SEQ ID NO is replaced by one of 556, 566, 576, 586, 596, 648, 658, 666, 676, 686, 696, 706, 716, 726, 736, 746, 758, 768, 42-47, 73-87, or 98-107, respectively.
Corresponding products and methods.

125-366. claims: 60, 62-88(all partially)

An IL-17 binding protein comprising at least one heavy chain variable region (VH region) comprising:
(a) three complementarity determining regions (CDRs) from any one of SEQ ID NOS: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803, and 811; or
(b) any one of SEQ ID NOS: 30, 32, 34, 108-115, 121-317, 527-534, 543, 553, 563, 573, 583, 593, 603, 608, 613, 618, 623, 628, 633, 638, 641, 651, 663, 673, 683, 693, 703, 713, 723, 733, 743, 751, 761, 773, 778, 783, 788, 793, 798, 803 and 811.
Wherein each SEQ ID NO corresponds to one "invention".
Corresponding products and methods.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

367-608. claims: 61-88(partially)

An IL-17 binding protein comprising at least one light chain variable region (VL region) comprising:
(a) three complementarity determining regions (CDRs) from any one of SEQ ID NOS: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, and 812; or
(b) any one of SEQ ID NOS: 31, 33, 35, 116-120, 318-526, 535-539, 548, 558, 568, 578, 588, 598, 646, 656, 668, 678, 688, 698, 708, 718, 728, 738, 748, 756, 766, and 812.
Wherein each SEQ ID NO corresponds to one "invention".
Corresponding products and methods.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ___

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 22-05-14
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **ABBVIE INC.**

(72) Inventor(es): HSIEH, Chung-Ming; PEREZ, Jennifer; BENATUIL, Lorenzo; KUTSKOVA, Yuliya; MEMMOTT, John; ZHONG, Suju; EATON, Lucia; HUGUNIN, Margaret; BRITO, Alyssa y CLABBERS, Anca.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	61/550,619	24-10-11	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 24-05-14
(86) Datos relativos a la presentación de la solic. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 24-10-12
No. de solicitud: ***PCT/US2012/061686***

(87) Publicación internacional:
Fecha: ***02-05-13***
No. Publicación: ***WO 2013/063110 A1***

(54) Titulo**: INMUNOLIGANTES BIESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA TNF E IL-17.**

(57) Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Se proporcionan proteínas de unión multiespecíficas y multivalentes diseñadas, métodos de fabricación, y específicamente sus usos en la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad.

Sector: Sector Biotecnológico. Proteínas de unión multi-específicas y multivalentes que unen TNF e IL-17, útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, cáncer, entre otras.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT __X__ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 22-05-14
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): **ABBVIE INC.**

(72) Inventor(es): HSIEH, Chung-Ming; PEREZ, Jennifer; BENATUIL, Lorenzo; KUTSKOVA, Yuliya; MEMMOTT, John; ZHONG, Suju; EATON, Lucia; HUGUNIN, Margaret; BRITO, Alyssa y CLABBERS, Anca.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) ***No. Prioridad***	(32) ***Fecha***	(33) ***País***
	61/550,619	24-10-11	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 24-05-14
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 24-10-12
No. de solicitud: ***PCT/US2012/061686***

(87) Publicación internacional
Fecha: ***02-05-13***
No. publicación: ***WO 2013/063110 A1***

(54) Titulo: **INMUNOLIGANTES BIESPECIFICOS DIRIGIDOS CONTRA TNF E IL-17.**